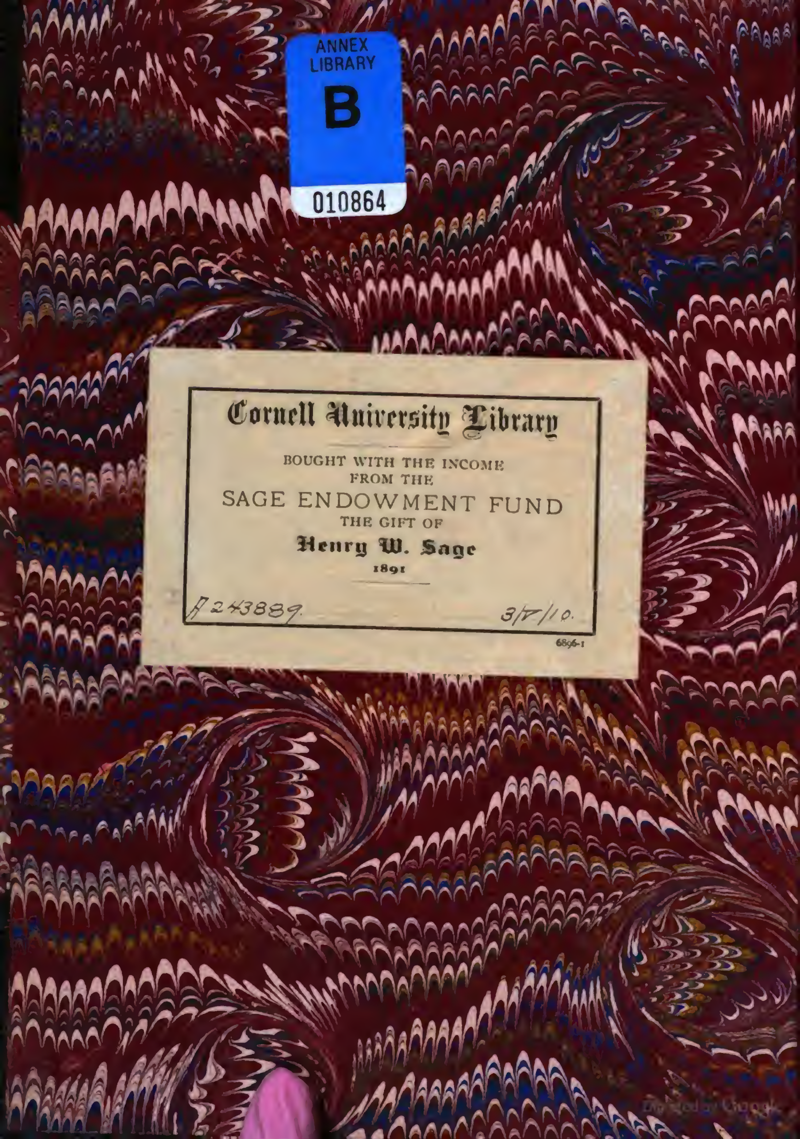
# ARCHIV FÜR HYGIENE UND BAKTERIOLOGIE




ANNEX
LIBRARY
B
010864



# ARCHIV FÜR HYGIENE.

(BEGRÜNDET VON MAX v. PETTENKOFER)

UNTER MITWIRKUNG

VON

Prof. Dr. O. BOLLINGER, München; Prof. Dr. BONHOFF, Marburg a. L.; Prof. Dr. R. EMMERICH, München; Prof. Dr. F. ERISMANN, Zürich; Prof. Dr. HEIM, Erlangen; Prof. Dr. F. HUEPPE, Prag; Prof. Dr. KABRHEL, Prag; Prof. Dr. F. KRATSCHMER, Wien; Prof. Dr. K. LEHMANN, Würzburg; Prof. Dr. A. LODE, Innsbruck; Prof. Dr. L. PFEIFFER, Rostock; Prof. Dr. W. PRAUSNITZ, Graz; Prof. Dr. F. RENK, Dresden; Prof. Dr. SCHOTTELIUS, Freiburg i. B.; Generaloberarzt Dr. A. SCHUSTER, München; Prof. Dr. M. SILBERSCHMIDT, Zürich; Prof. Dr. WERNICKE, Posen.

HERAUSGEGEBEN

VON

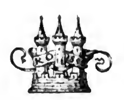
J. FORSTER, M. GRUBER, FR. HOFMANN, M. RUBNER,

O. Ö. PROFESSOREN DER HYGIENE UND DIREKTOREN DER HYGIENISCHEN INSTITUTE AN DEN UNIVERSITÄTEN ZU

STRASSBURG MÜNCHEN LEIPZIG BERLIN.

**VIERUNDSECHZIGSTER BAND**

**Mit 3 Tafeln und 8 Abbildungen**




MÜNCHEN UND BERLIN

DRUCK UND VERLAG VON R. OLDENBOURG

1908

# Inhalt.

Seite

# Über die Ammoniakbildung bei einigen Bakterienarten.

Von

Stabsarzt Dr. **Berghaus,**

früherem Assistenten am Institute.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Rubner.)

In drei grundlegenden Arbeiten: »Energieverbrauch im Leben der Mikroorganismen«[1]), »Die Beziehungen zwischen Bakterienwachstum und Konzentration der Nahrung (Stickstoff- und Schwefelumsatz)[2]) und »Energieumsatz im Leben einiger Spaltpilze«[3]) zeigt uns Rubner die Wege, auf denen uns ein Einblick in die bisher wenig gekannten Ernährungs- und Lebensvorgänge der Bakterien möglich ist. Exakte Methoden wurden ausgearbeitet und mit ihnen in gröſseren Versuchsreihen die Leistungen der Lebenstätigkeit quantitativ analysiert. Wachstums- und Kraftwechseltätigkeit wurden scharf voneinander getrennt und einzeln in ihren Endprodukten untersucht und uns damit ein Bild sowohl über die Einzelleistungen, als auch über die Beziehungen dieser beiden Prozesse zueinander gegeben.

Für die Beurteilung der Wachstumsvorgänge oder des »Ansatzes«, wie Rubner im Gegensatz zum »Umsatz«, dem eigentlichen Stoff- oder Kraftwechsel diese Prozesse bezeichnet, bildeten

1) Archiv f. Hygiene, 1904, Bd. 48, S. 260.
2) Archiv f. Hygiene, 1906, Bd. 57, S. 161.
3) Archiv f. Hygiene, 1906, Bd. 57, S. 193.

genaue Erntebestimmungen die Grundlage. Nachdem mittels Eisenazetat die Keime in der Wärme mechanisch aus ihren Nährlösungen gefällt worden waren, wurde in Analogie der in der Tierphysiologie gebräuchlichen Methode als Mafsstab für die Wachstumsgröfse der in den Bakterienleibern vorhandene Stickstoffgehalt, in einigen Versuchen auch der Schwefelgehalt festgestellt; in mehreren Fällen wurde diese Analyse noch durch Messung der Verbrennungswärme vervollständigt.

Die im Kraftwechsel vor sich gegangenen Umsetzungen wurden durch zwei Methoden bestimmt, einmal indem die Verbrennungswärme eines Nährbodens vor dem Wachstum von Bakterien, und dann nach demselben, nachdem der Bakterienrasen entfernt war, festgestellt wurde (Differenzmethode), dann aber mittels der »direkten Methode« durch Messung der entwickelten Wärme während des Lebensprozesses selbst.

An der Hand dieser Versuchsmethodik konnte Rubner unter anderem den zahlenmäfsigen Beweis erbringen, dafs von den durch die Lebenstätigkeit der Bakterien hervorgerufenen chemischen Umsetzungen nur der kleinere Teil auf Rechnung der Wachstumsvorgänge zu setzen sei, der gröfsere aber durch den eigentlichen Stoffwechsel, den Umsatz bedingt werde. So wurden z. B. vom Bact. proteus in den ersten 10 Tagen in einer Nährlösung nur 3,01 Kalorien angesetzt, aufserdem aber 12,32 umgesetzt, somit war der Umsatz ca. 4 mal so grofs als der sichtbare Wachstumseffekt. Bei längerer Dauer stieg der Kalorienverbrauch für den Umsatz auf 22,75 Kalorien, wohingegen das Wachstum sistierte.

Nachdem in diesen Versuchen Klarheit in die komplizierten allgemeinen biologischen Vorgänge gebracht worden war, lag der Gedanke nahe, auch einzelne Produkte aus den Wachstums- und Stoffwechselvorgängen einer näheren Untersuchung zu unterziehen und sie für die Beurteilung der Lebensprozesse zu verwerten. Ihre Deutung mufste auf um so weniger Schwierigkeiten stofsen, als ja in den oben zitierten Versuchen genügend Anhaltspunkte gegeben waren.

Wie Rubner zur Bestimmung der Wachstums- (einschl. der Vermehrungs-)gröſse als Maſsstab den Stickstoffgehalt der gewachsenen Bakterienmasse feststellte, da dieses Element an dem Aufbau des Zellleibes in hervorragendem Maſse beteiligt ist, so müssen aus demselben Grunde auch die stickstoffhaltigen und unter ihnen die Protein-Substanzen in dem Verhältnis, wie sie zum Leben benötigt werden, den Zersetzungsprozessen zum Opfer fallen und uns damit einen Rückschluſs auf die gesamte Lebenstätigkeit ermöglichen. Bekanntlich ist die groſse Mehrzahl der Bakterien imstande, aus den eiweiſshaltigen Substanzen allein ihren Stickstoff- und auch Kohlenstoffgehalt zu decken und gerade aus der Gröſse der chemischen Umlagerungen in einem derartigen Nährsubstrat dürfen mit um so gröſserer Sicherheit zutreffende Schlüsse gezogen werden, als ja die Keime in dieser Nahrung wohl meist nie präformierte aufnahmfähige Substanzen vorfinden, sondern das Grundmaterial erst in eine zum Ansatz geeignete Form bringen müssen. Daſs die energetischen Vorgänge des Umsatzes, des eigentlichen Stoffwechsels, naturgemäſs in den Zerlegungen des Nährsubstrats zum Ausdruck kommen müssen, bedarf wohl nicht erst einer weiteren Erläuterung und muſs ich hier auf die eingehenden Ausführungen Rubners in den eingangs erwähnten Abhandlungen verweisen.

Die Tatsache der $NH_3$-Bildung genügt an sich nicht, um irgendwelche weitere Schlüsse über die Bedeutung dieses Vorkommnisses zu ziehen. Es ist noch notwendig zu wissen, bei welchem Teil des Ernährungsvorganges die Spaltung eintritt und aus welchen Gründen sie erfolgt. Auf Anregung des Herrn Geheimrat Rubner habe ich es daher unternommen, einige Punkte dieser $NH_3$-Bildung aufzuklären und an einigen, wenn auch nur wenigen Keimen solche Untersuchungen angestellt.

Wie Rubner dargetan hat, ist es notwendig, bei allen Betrachtungen über die Ernährung der Mikroorganismen genau auseinanderzuhalten, daſs Wachstum und Umsatz die beiden Kardinalvorgänge sind. Ihrem inneren Wesen nach sind beide häufig entgegengesetzter Natur, — beim Wachstum Anhydrid-

bildungen, Synthesen, — bei dem Stoffwechsel hydrolytische Prozesse, Spaltungen, Oxydationen.

Man erwartet gewöhnlich, dafs dort, wo in eiweifshaltigem Material Mikroorganismen sich finden, auch Umsetzungen mit Entwicklung von $NH_3$ vor sich gehen; dafs manche Bakterien eine sehr kräftige Umsetzung N-haltiger organischer Nährstoffe herbeiführen, ist bekannt. Die stark alkalische Reaktion faulender Massen ist typisch für eine ganze Gruppe solcher Spaltungsvorgänge. Sie rührt ja manchmal bei den Bakterien von der Bildung fixen Alkalis oder von organischen Basen her, oft genug aber beruht sie tatsächlich gänzlich auf der $NH_3$-Erzeugung. Im Fleischextrakt kann durch den Proteus vulgaris, wie Rubner nachgewiesen, über 20% des N in $NH_3$ übergeführt werden.

Sogenannte $NH_3$-Bildner scheinen recht häufig unter den Mikroorganismen vorzukommen. Marchal[1]) hat mit Rücksicht auf die Ziele der Landwirtschaft die im Ackerboden vorkommenden Organismen auf diese Fähigkeit geprüft und bezeichnet als $NH_3$-Bildner den Bac. mycoides, Bac. fluorescens liquefaciens, Bac. fluorescens putidus, Bac. subtilis, Bac. arboreszens, Bac. mesentericus vulg., Bac. mesentericus ruber, Bac. termo Proteus, Sarcina lutea, Microc. roseus, Microc. flavus, candicans; ferner Aspergillus terricola, Penicill. glaucum, Mucor mucedo, racemosus, Penicill. cladosporioides und zwei Saccharomycesarten.

Am meisten $NH_3$ soll der Bac. mycoides liefern, er zerlegt Leucin, Tyrosin, greift aber den Harnstoff nicht an.

Die $NH_3$-Bildung braucht keineswegs überall aufzutreten, wo organische N-Verbindungen im Leben der Mikroorganismen benötigt werden. Gewifs benutzen viele der letzteren solche Körper nur zum Aufbau, spalten aber kein $NH_3$ ab, sondern verwenden es zur Synthese des Eiweifses wie z. B. die Hefe. Es ist nur dort eine gröfsere Menge von $NH_3$ zu erwarten, wo ein Stoffwechsel mit Abbau von Eiweifs oder Ei-

1) Émil Marchal, The production of ammonia in the soil by Microbes. Agricult. Science 1894, vol. VIII, p. 574, ref. Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde 1895, 2. Abt., Bd. I, S. 753.

weifsstücken (Polypeptiden, aminosauren, diaminosauren Verbindungen der aromatischen Reihe usw.) stattfindet. Derartige Lösungen des Amid- oder Imidstickstoffes lassen schon vom thermochemischen Standpunkte, wie Rubner annimmt, es als wahrscheinlich und geradezu sicher erscheinen, dafs aus ihnen nutzbare Kräfte gewonnen werden. Die Abspaltung des Ammoniaks und der methylierten Derivate ist also, wenn ein Vergleich mit den höherstehenden Organismen gewählt werden darf, den N-haltigen Auswurfstoffen der Warm- und Kaltblüter analog. Ob aber nebenbei Bakterien, welche kompliziertere N-haltige Stoffe spalten, und zwar auf dem Wege einfacher Hydratationsvorgänge — also auch anaerob — zugleich mit der Fähigkeit ausgerüstet sind, aerob Oxydationen des $NH_3$ in $NO_2$ H, $NO_3$ H auszuführen, müfste Gegenstand besonderer Untersuchung sein. Vorgänge dieser Art kennen wir ja bei der Hefe (Bierhefe) innerhalb des Kohlehydratabbaues. Dieser Organismus spaltet den Zucker in $CO_2$ und Alkohol, aber unter anderen Umständen wird ein Teil des Zuckers in $CO_2$ und $H_2O$ zerlegt.

Ob im Wachstumsprozefs auch von Fäulniskeimen selbst $NH_3$-Gruppen abgestofsen werden, ist weder bewiesen noch widerlegt, ja überhaupt nicht untersucht, aber es ist von vornherein unwahrscheinlich, dafs das Wachstum im engeren Sinne eine $NH_3$-Quelle von quantitativer Bedeutung sei. Man müfste denn annehmen, dafs bei der Synthese einfacher kleinerer Moleküle zu Eiweifs überschüssige $NH_3$-Gruppen abgestofsen werden. Rubner hält derartige Vorgänge für ziemlich unwahrscheinlich, da bei der Spaltung N-haltigen organischen Materials gerade die locker sitzende $NH_2$-Gruppe zu allererst abfällt, und somit die kleineren Bruchteile des Eiweifses und seiner Derivate vor allem eher einen Mangel an $NH_2$ zeigen, also dessen sie bei dem Wiederaufbau des Eiweifses in allererster Linie bedürfen.

Meine Untersuchungen an Bakterien habe ich vorläufig auf den üblichen flüssigen Nährböden angestellt, d. h. auf Bouillon, die ja chemisch eine sehr komplizierte Zusammensetzung hat; späterhin wird man zu dem Studium der Zersetzung chemisch genau bekannter Verbindungen übergehen müssen. Dies setzt

allerdings die Herstellung einfachster Nährböden voraus, die aus chemisch reinen Körpern bereitet werden.

Meine Untersuchungen sollten zunächst nur einen ersten Schritt für das nähere Studium des Abbaues komplizierter N-haltiger Nährstoffe bedeuten. Es wurde Gewicht darauf gelegt, nicht nur überhaupt das Auftreten von $NH_3$-Verbindungen festzustellen, sondern den ganzen Verlauf dieser Spaltungen in längeren Versuchsreihen kennen zu lernen. Ich habe daher die $NH_3$-Produktion bei mehreren Keimen längere Zeit hindurch quantitativ bestimmt, indem täglich bestimmte Mengen des Nährbodens daraufhin untersucht wurden. Wie ich gleich bemerken möchte, lag es nicht in meiner Absicht, die einzelnen flüchtigen Basen quantitativ festzustellen, sie wurden auch qualitativ nicht näher untersucht, sondern nur ihrer Gesamtmenge nach quantitativ bestimmt. So sind demgemäfs in den unten angegebenen Werten Körper verschiedener Zusammensetzung, so z. B. Dimethylamin, Trimethylamin, Tetra- und Pentamethylendiamin enthalten, Stoffe, die bekanntlich vielfach bei der Bakterienkultur gefunden werden; der Hauptmasse nach tritt bei ihnen aber das Ammoniak in den Vordergrund, weshalb im folgenden unter dieser Bezeichnung sämtliche flüchtige Basen zusammengefafst sein mögen. Dafs übrigens methylierte $NH_3$-Verbindungen auftreten, darüber konnte, nach dem Geruche mancher Kulturen beurteilt, nicht der geringste Zweifel obwalten.

Es wurden folgende Bakterienarten zur Untersuchung herangezogen:

1. Bact. proteus vulg.;
2. Bact. coli (2 Stämme Aue und F);
3. Typhusbazillus;
4. Bac. faecalis alcaligenes;
5. Cholera-Vibrio;
6. Bac. prodigiosus.

Die Aussaat dieser Keime erfolgte ausschliefslich in Bouillon. Nachdem ich zunächst mit aus Rindfleisch hergestellter Bouillon Vorversuche angestellt und mich damit auf eine möglichst

exakte Analysierung eingeübt hatte, wurde für die weiteren Untersuchungen nur noch Pferdefleischbouillon verwendet, die die für Nährbouillon üblichen Zusätze von 1% Pepton und 0,5% Kochsalz enthielt; bei einem Versuch wurde noch 1% Traubenzucker zugesetzt.

Die Bestimmung des Ammoniaks geschah nach der von Schlösing angegebenen Methode (Fresenius, Anleitung zur quantitativen chemischen Analyse, Bd. 1, S. 225), wie sie auch für die Ammoniakbestimmung im Harn in Gebrauch ist. Sie besteht bekanntlich in der mechanischen Austreibung des Ammoniaks durch Kalkmilch und hat vor anderen Methoden den Vorzug, dafs sie ohne Anwendung von Wärme vor sich geht und damit weitere Zersetzungen organischer stickstoffhaltiger Substanzen vermieden werden.

Für die jedesmalige Bestimmung wurden 50 ccm der Bouillonkultur mittels eines langen Trichters auf den Boden eines sauberen Exsikkators gebracht und dazu mittels desselben Trichters 50 ccm frischer Kalkmilch gegeben. Zum Auffangen des Ammoniaks dienten 10 ccm $\frac{n}{1}$ Schwefelsäure, die in einem ca. 3 cm hohen Schälchen enthalten war, das auf Glasstäbchen über der Einschnürung des Apparates stand. Mit dem gut eingefetteten Deckel wurde sofort nach der Beschickung der Exsikkator luftdicht verschlossen, der nun 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen blieb. Diese von Schlösing angegebene Zeit genügte, wie ich durch Kontrolle feststellte, völlig, um alles Ammoniak auszutreiben und durch die Schwefelsäure zu binden. Nach dieser Zeit wurde mittels $\frac{n}{4}$ Natronlauge die Menge der noch freien Säure titriert und aus dem Verlust der Ammoniakgehalt berechnet. Die Titration wurde in dem Schwefelsäure-Schälchen selbst vorgenommen, so dafs jegliches Verschütten von Säure vermieden wurde. Von vornherein hatte ich mir nicht unerhebliche Mengen der betreffenden Reagentien hergerichtet, so dafs ich niemals genötigt war, zweierlei Lösungen zu verwenden, was ja bekanntlich, abgesehen von zeitraubenden Umrechnungen,

leicht zu Versuchsfehlern führen kann. Die Schälchen, die zur Aufnahme der Schwefelsäure dienten, wurden stets vorher mit destilliertem Wasser peinlichst ausgespült.

Bei allen meinen Versuchen war die erste Aufgabe festzustellen, ob nicht bereits in der verwendeten sterilen Nährlösung von vornherein Ammoniakverbindungen enthalten seien. Dieses war tatsächlich der Fall. Die aus Rinder- bzw. Pferdefleisch hergestellten Bouillonarten wiesen hier geringe Differenzen auf, und zwar entsprach der $NH_3$-Gehalt pro 50 ccm.

der Rindfleischbouillon 4,25 mg $NH_3$ = 3,48 N,
der Pferdefleischbouillon 2,975 » » = 2,43 »

In den Fleischextraktstoffen sind bereits kleine Mengen von $NH_3$, reichlicher an solchen ist namentlich das Pepton des Handels. Weiterhin bedurfte es der Untersuchung, ob durch längeres Stehen, insbesondere bei Bruttemperatur — in letzterer wurde die Züchtung der Keime vorgenommen — eine Zerlegung und damit eine Produktion von Ammoniak hervorgerufen werden könne. Dieses trat nicht ein; auch bei längerer (ca. 14 Tage) Beobachtung blieb der Gehalt an flüchtigen Basen konstant, wie tägliche Kontrollen ergaben. Somit konnte jeder Unterschied in dem Ammoniakgehalt der sterilen und besäten Bouillon als ein Ausdruck der Einwirkung der Keime angesehen werden. Zu vielen Versuchsreihen wurden stets ca. 50 ccm Bouillon verwendet, die von vornherein auf einzelne Erlenmeyersche Kölbchen abgeteilt worden waren, so dafs also stets der gesamte Inhalt eines Kölbchens zur Untersuchung gelangte; in den weiteren Versuchen ging ich dazu über, gröfsere Quantitäten Nährlösung in Flaschen zu impfen, von denen dann täglich die nötige Menge (je 50 ccm) entnommen wurde.

Die Kölbchen blieben nur mit Watte verschlossen im Brutschrank. Da man nur verhältnismäfsig wenig $NH_3$ erwarten durfte, glaubte ich vorerst annehmen zu dürfen, dafs die N-Abgabe durch Verdunstung keine sehr erhebliche sei, wennschon mir bekannt war, dafs Rubner bei seinen Versuchen mit Proteus vulg. (a. a. O.) nachgewiesen hat, dafs in Wochen dauernden Experimenten der N-Verlust bemerkenswerte Gröfsen darstellen

kann. Wie richtig diese Beobachtung war, zeigte der weitere Verlauf meiner Untersuchungen, in denen es sich erwies, dafs man von Anfang an trotz kleinster Mengen von $NH_3$ die Verflüchtigung mit in Rechnung zu ziehen ist. Diese Versuche mit genauer Bilanz will ich im II. Teil meiner Arbeit besonders besprechen.

Zunächst beschränkte ich mich darauf, lediglich den Gehalt an $NH_3$ der Nährlösung zu bestimmen, später wurden hiermit auch Keimzählungen verbunden. Die in den Kurven niedergelegten Keimzahlwerte geben Mittelwerte aus je zwei Zählungen von Aussaten in Gelatineplatten.

Noch eine andere Seite der Frage der $NH_3$-Bildung habe ich einer Beachtung wert gehalten. Man darf nämlich keineswegs alle durch Bakterien entstehende Umsetzungen als vitale Prozesse im engeren Sinne betrachten, es ist bekannt, wie häufig auch fermentative Vorgänge in den Abbau eingreifen, und seit den Untersuchungen E. Buchners müssen wir selbst bei komplizierten Umsetzungen zum mindesten einen erheblichen Teil als Vorgänge fermentativer Natur ansehen. Um also auch die Einwirkung abgetöteter Keime auf die $NH_3$-Bildung feststellen zu können, wurden Bouillonkulturen nach 24stündigem Wachstum mit Toluol übergossen und abgetötet. In einem Versuch wurde noch mit Aceton abgetöteter Bakterienrasen der Bouillon zugesetzt.

Mit Ausnahme der Prodigiosusbouillon wurden die anderen Bouillonkulturen stets bei 37° gehalten, erstere dagegen bei 27°.

In allen Fällen habe ich in den Angaben und in den graphischen Darstellungen, die von Beginn des Versuches ab in 50 ccm Nährflüssigkeit sich ansammelnde Menge $NH_3$ angegeben. Wenn man die Veränderungen in dem $NH_3$-Gehalt von einem Tage zum anderen erkennen will, so mufs man die aufeinanderfolgenden Werte voneinander abziehen.

Man wird namentlich dort, wo eine Reihe von Kölbchen gleichzeitig infiziert worden war und an den aufeinanderfolgenden Tagen je eine Probe in Arbeit genommen wurde, nicht immer

erwarten können, dafs eine absolut gleichmäfsig fortschreitende $NH_3$-Produktion gefunden wird, weil ja natürlich das Wachstum nicht in allen Kölbchen absolut gleichmäfsig vorwärts schreitet, und weil man mit einer Abgabe von $NH_3$ durch Verdunstung rechnen mufs.

Bevor ich an die nähere Untersuchung der einzelnen Kurven gehe, sei zur allgemeinen Orientierung zunächst eingefügt, was allen Kurven in mehr oder minderem Mafse gemeinsam ist, wie ein Blick auf die Tabellen zeigt. Dort, wo lebende Kulturen zur Untersuchung kamen, können von vornherein zwei Stadien in der Ammoniakansammlung unterschieden werden. Nachdem gleich in den ersten 24 Stunden eine nicht unerhebliche $NH_3$-Produktion erfolgt ist, welche die Menge der in der Bouillon präformiert enthaltenen vielfach um das Doppelte und mehr übersteigt, tritt für längere Zeit — die Dauer schwankt bei den verschiedenen Keimarten und auch bei derselben Art in verschiedenen Versuchen — eine Periode ein, in der zum Teil unter nicht unerheblichen Schwankungen ein allmähliches Steigen der $NH_3$-Kurve zu konstatieren ist. Alsdann setzt plötzlich und unvermittelt bei der Mehrzahl der Keime eine kräftige $NH_3$-Ansammlung ein, die auch für die weitere Dauer des Versuches bestehen bleibt, hin und wieder von Remissionen unterbrochen wird.

Zur jedesmaligen Analyse wurden 50 ccm Bouillonkultur, der Gesamtinhalt eines Erlenmeyerschen Kölbchens, genommen.

**1. Ammoniakkurve des Bact. coli (Aue).** (Fig. 1.)

Nach den ersten 24 Stunden sind in 50 ccm Bouillon 1,7 mg $NH_3$ mehr enthalten als in der unbesäten, am 2. Tage ist kein Unterschied vorhanden, von da ab steigt die Kurve mit einer unbedeutenden Remission bis zum 8. Tage, um nach einem erheblichen Abfall an diesem Tage in das zweite Stadium zu treten, in dem der hohe Anstieg im Vordergrund steht.

**2. Ammoniakkurve des Bact. proteus.** (Fig. 1.)

Die Ammoniakbildung ist von vornherein kräftiger als beim Bact. coli. Bis zum 6. Tage steigt die Kurve stufenförmig, um

an diesem Tage auf ihr ursprüngliches Niveau abzufallen, dann aber erhebt sie sich mit nur wenigen und verhältnismäfsig nur geringen Remissionen zu bedeutender Höhe.

Fig. 1. Ammoniakbildung bei Bakterien.

+—+ + = $NH_3$-Kurve für 50 ccm Pferdefleischbouillon (37°).
——— = „ „ „ „ + prodigiosus (27°).
—·—·— = „ „ „ „ + Coli Aue (37°).
------- = „ „ „ „ + proteus (37°).

7,0 ccm $\frac{n}{4}$ NaOH = 29,75 mg $NH_3$
6,5 „ „ „ = 27,625 „ „
6,0 „ „ „ = 25,50 „ „
5,5 „ „ „ = 23,375 „ „
5,0 „ „ „ = 21,25 „ „
4,5 „ „ „ = 19,125 „ „
4,0 „ „ „ = 17,00 „ „
3,5 „ „ „ = 14,875 „ „
3,0 „ „ „ = 12,75 „ „
2,5 „ „ „ = 10,625 „ „
2,0 „ „ „ = 8,50 „ „
1,5 „ „ „ = 6,375 „ „
1,0 „ „ „ = 4,25 „ „
0,5 „ „ „ = 2,125 „ „
0,0 „ „ „ = 0 „ „

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. Tag

**3. Ammoniakkurve des Bact. prodigiosus.** (Fig. 1.)

Die Bouillonkulturen dieser Bakterienart, die während des ganzen Versuches bei 27° gehalten wurden, zeigen zunächst bis zum 9. Tage ein ganz allmähliches Ansteigen der $NH_3$-Produktion. Von da ab ist der Verlauf der Kurve sehr unregelmäfsig. Nach ziemlich erheblichen Schwankungen, bei denen die frühere Höhe nicht wieder erreicht wird, beginnt am 15. Tage wiederum der Anstieg, welcher am 16. Tage fast das Vierfache der anfänglichen Höhe erreicht. Dann wechselt wieder tiefer Abfall mit einem Anstieg, der den ersten noch bedeutend überholt, mit einem Sinken der $NH_3$-Bildung schliefst am 21. Tage der Versuch.

**Ammoniakbildung beim Choleravibrio.** (Fig. 2.)

Wie bei den vorstehenden Versuchen, wurden auch hier Bouillonkulturen untersucht, die zu 50 ccm in einzelnen Erlen-

meyerschen Kölbchen enthalten waren. In jede 50 ccm waren 603162 Keime ausgesät. Mit der $NH_3$-Bestimmung fand gleichzeitig eine Keimzählung in der oben angegebenen Weise statt.

Die Bakterienentwicklung war bereits nach 24 Stunden in ein Maximum getreten, die Zahl fällt von dort bis zum 6. Tage von dem ab die Nährflüssigkeit sich stets steril erwies, rasch ab.

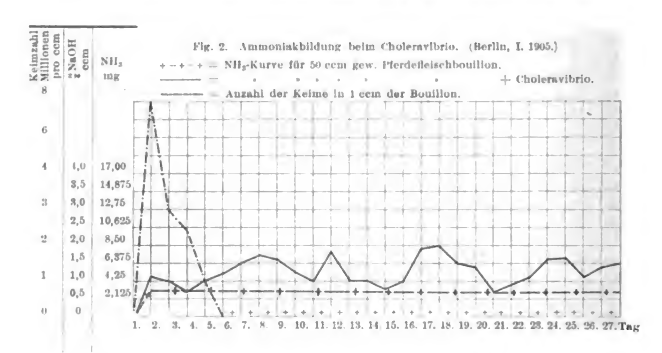


Fig. 2. Ammoniakbildung beim Choleravibrio. (Berlin, I. 1905.)

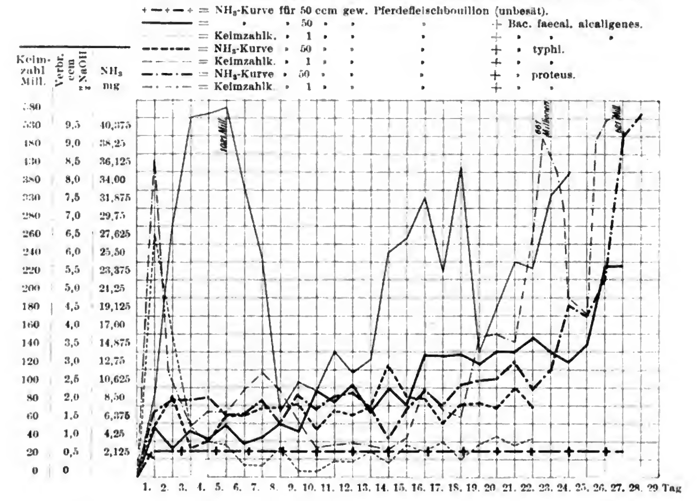
Die Ammoniakansammlung in der Kultur überdauert die Wachstumsperiode, sie schwankt um einen Mittelwert, der ziemlich gleichbleibende Werte bis zum 27. Tage wahrnehmen läfst. Es ist also wohl wahrscheinlich, dafs täglich noch geringe Mengen von $NH_3$ entstanden sind, da Verluste an $NH_3$ unvermeidlich gewesen sein dürften. Die Ursache kann darin liegen, dafs die Choleravibrionen nicht in dem Momente abgestorben sind, in welchem die Bakterien nicht mehr kultivierbar sind, sondern beschränkte Zeit noch weiterleben, oder dafs nebenbei auch fermentative Prozesse in Betracht kommen.

### 1. Der Typhusbazillus. (Fig. 3.)

Nach den ersten 24 Stunden zeigt sich eine Zunahme von Ammoniak um 2,975 mg für 50 ccm, die Anzahl der Keime be-

trägt 250 Millionen pro 1 ccm, am folgenden Tage steigt der $NH_3$-Gehalt nochmals um 3,4 mg, wohingegen der Keimgehalt auf 160 Millionen sinkt. Am 3. Tage erreicht die $NH_3$-Kurve ihren tiefsten Stand, der $NH_3$-Gehalt ist in der besäten und un-

Fig. 3. Ammoniakbildung bei dem Bac. faecal. alcaligenes, Bact. proteus u. Bact. typhi.




besäten Bouillon gleich, um dann allmählich wieder bis zum 7. Tage zu steigen. Die Bakterienkurve fällt ständig bis zum 7. Tage und bleibt dann mit geringen Schwankungen auf dem einmal erreichten Niveau stehen. Nach einem Abfall am 8. Tage beginnt wieder eine vermehrte $NH_3$-Produktion, unterbrochen von einzelnen Remissionen, die am 14. Tage ihren Höhepunkt erreicht, dann weiter unregelmäfsiger Verlauf.

Das Ergebnis bei den Typhusbazillen führt uns zu denselben Schlüssen wie bei dem Choleravibrio. Die $NH_3$-Ansamm-

lung hat zweifellos mit dem Wachstum im engeren Sinne nichts zu tun, sondern sie hält sich auf alter Höhe, wenn bereits die Zahl der kultivierbaren Zellen stark in Abnahme begriffen ist.

Die weiteren nun folgenden Versuche (Fig. 3) sind mit etwas modifizierter Methode ausgeführt worden. Da bei der Anwendung zahlreicher Proben von Kulturen, wie in den bisherigen Versuchen beschrieben, mit einem ungleichen Wachstum in einzelnen Versuchskölbchen gerechnet werden mufste, so geschah bei den übrigen, dem Bact. proteus und Bact. faecalis alcaligenes die Aussaat in gröfsere, in Flaschen enthaltene Mengen Bouillon, von der dann täglich die benötigten 50 ccm zur Untersuchung entnommen wurden. Wie früher ging auch jetzt neben der Ammoniakbestimmung die Keimzählung einher. Durch diese Neuerung wurde aber insofern eine wichtige Änderung herbeigeführt, als natürlich von Anfang an die Aussaat vielleicht das 30fache an Nährwerten vorfand, als wenn nur 50 ccm Volumen infiziert worden wären. Auch die Dauer der Wachstumszeit mufs naturgemäfs verlängert werden, weil mehr Nahrungsvorrat vorhanden ist, und die Stoffwechselprodukte anfänglich wegen gröfserer Verdünnung weniger stören.

### 2. Bact. proteus. (Fig. 3.)

Die $NH_3$-Kurve unterscheidet sich nicht unwesentlich von der der Tabelle I. Nach einem anfänglichen (bis zum 5. Tage) Steigen tritt ein Rückgang ein bis zum 14. Tage, erst dann beginnt mit nur einer einzigen Unterbrechung ein Anstieg zu einer ganz bedeutenden Höhe. Die Bakterienkurve fällt, während die des $NH_3$ noch steigt, bereits am 2. Tage von 460 Millionen auf 108 Millionen Keime pro 1 ccm, bei weiter sinkender Keimzahl (58 Millionen) bleibt die $NH_3$-Kurve auf derselben Höhe, sie fällt alsdann, wohingegen die Anzahl der Keime wieder zunimmt; aber auch das Umgekehrte kann vom 11. bis 14. Tage beobachtet werden. Vom 16. Tage ab zeigen beide Kurven gleichmäfsig die Tendenz zum Steigen und die Bakterienkurve weist am 24. Tage eine Zahl auf, die fast der am 1. Tage gefundenen gleichkommt. Diese hohe Keimzahl liegt aber nicht etwa darin, dafs in dieser

Zeit eine nochmalige Vermehrung sich eingestellt hat, sondern ist darauf zurückzuführen, dafs mit der zur Neige gehenden Bouillon immer gröfsere Mengen Bodensatz zur Untersuchung kamen, der während der Versuchszeit sich gebildet hatte und sich trotz kräftigen Schüttelns wegen seiner schleimigen und zusammenhängenden Beschaffenheit nicht gleichmäfsig verteilen liefs. Aus diesem Grunde unterblieb auch in den letzten Tagen des Versuches die Keimzählung. Jedenfalls aber waren in diesem Experiment auch am Ende der Versuchszeit noch reichlich entwicklungsfähige Keime neben grofsen Mengen bereits des Wachstums nicht mehr fähigen vorhanden.

### 3. Der Bac. faecalis alcaligenes. (Fig. 3.)

Aufser dem anaerob gut wachsenden, als typischen Fäulniserreger anzusehenden Proteus vulgaris kam mit dem Bac. faecalis alcaligenes eine Bakterienart zur Untersuchung, welche grofses Sauerstoffbedürfnis besitzt und jedenfalls aerobes Leben bevorzugt. Seinen Namen verdankt er der kräftigen alkalischen Reaktion, welche er in den Nährböden hervorruft. Wahrscheinlich wird allerdings diese Alkaleszenz nicht allein von den $NH_3$-Verbindungen erzeugt, jedenfalls ist sie aber doch in hohem Grade von der Bildung des $NH_3$ und seiner Derivate abhängig. Der Bac. faecalis alcaligenes bringt den Beweis, dafs die $NH_3$-Abspaltung kein Vorgang ist, der in irgendeiner Weise durch anaerobes Leben etwa erzwungen wird. Die $NH_3$-Abspaltung und Zerlegung komplexerer Verbindungen ist eine spezifische Eigenschaft vieler Zellen, die sofort sich geltend macht wenn geeignete Nährstoffe vorhanden sind, ja vielleicht sogar den wesentlichsten Teil des Kraftwechsels bedeutet.

Die $NH_3$-Kurve zeigt bis zum 9. Tage wenig Neigung zum Steigen, mit dem 10. Tage setzt die Ammoniakbildung ein, hält sich aber bis zum 15. Tage unter wechselndem Auf- und Abstieg in mäfsiger Höhe, um plötzlich und unvermittelt am 16. Tage in wesentlich höherem Mafse aufzutreten. Unter geringen Schwankungen dauert diese vermehrte Produktion bis zum 25. Tage. Bei der Untersuchung des Restes der Bouillon, ein-

schliefslich des Bodensatzes ergibt sich an den beiden letzten Tagen nochmals ein kräftiges Ansteigen der Kurve.

Die Bakterienkurve zeigt im Vergleich mit den früher beschriebenen mancherlei Abweichungen. Ihr Höhepunkt fällt nicht auf den 1. Tag, sondern unter allmählichem Anstieg von 90 Mill. Keimen am 1., 280 Mill. am 2., 582 Mill. am 3. und 593 Mill. am 4., erreicht sie diesen mit 1021 Keimen erst am 5. Tage. Während dieser Zunahme an Keimen ist die Ammoniakbildung am geringsten, ja an dem Tage, an dem die Keimzahl am gröfsten, ist fast der tiefste Stand der $NH_3$-Kurve.

Während des Abfalles der Bakterienkurve, der sich in zwei Tagen von 1021 Mill. über 385 auf 78 Mill. vollzieht, beginnt der $NH_3$-Gehalt wieder zu steigen und erreicht seine anfängliche Höhe wieder. Nach diesem Tiefstand tritt wiederum eine Vermehrung der Keime ein, die nicht unbeträchtlich ist, am 16. Tage wurden 360 und am 18. 450 Mill. Keime in 1 cm gefunden. Mit dieser Keimzunahme läuft parallel die $NH_3$-Bildung. Am 17. Tage fällt die Bakterienkurve steil ab bis auf 140 Mill. Keime pro 1 cm, um dann wieder bis zum Ende des Versuches zu steigen, während dieser Zeit hielt sich die $HN_3$-Kurve mit nur geringen Schwankungen auf derselben Höhe.

Zu dieser Bakterienkurve mufs ich noch bemerken, dafs ich nicht die Verantwortung übernehmen kann, dafs sie den tatsächlichen Verhältnissen entspricht. Die Eigentümlichkeit dieser Bakterienart, unter Häutchenbildung zu wachsen, macht jede exakte Keimzählung unmöglich. Es wurde zwar stets versucht, die Häutchen durch kräftiges Schütteln zu zerkleinern, ob aber damit eine gleichmäfsige Verteilung der Bakterienmasse erzielt worden ist, mufs ich dahingestellt sein lassen. Immerhin ist aber der Verlauf des zweiten Anstieges derart gleichmäfsig, dafs man wohl zu der Annahme berechtigt ist, dafs in dieser Zeit eine Vermehrung der Keime stattgefunden hat.

Auch bei dieser Bakterienart läfst sich ein quantitativer Zusammenhang zwischen den lebenden Keimen und der $NH_3$-Produktion nicht feststellen, wie wir gesehen haben, und es bleibt

nur übrig, diese auf den Einflufs der nicht mehr kulturfähigen Zellen und auf fermentative Prozesse zurückzuführen.

Das allgemeine Resultat der bisher mitgeteilten Versuche ist also folgendes:

In Kulturen der untersuchten pathogenen Keime erreicht die $NH_3$-Menge niemals eine sehr bedeutende Gröfse, die $NH_3$-Erzeugung geht aber zweifellos über die Periode des Wachstums und der Anwesenheit kulturfähiger Keime hinaus.

Bei den untersuchten Saprophyten erreicht die $NH_3$-Menge in der Kultur gerade nach längerer Zeit besonders hohe Werte. Bei diesen aber haben wir es mit Keimen zu tun, die in der Nährlösung sich längere Zeit kulturfähig halten.

Das stärkere Ansteigen des $NH_3$-Gehaltes nach der zweiten Woche läfst sich nur dadurch erklären, dafs entweder tatsächlich mehr erzeugt wird oder dafs in dieser Periode die Bindung in der Flüssigkeit eine günstigere wird. Wie ich zeigen werde, spielt nicht eine verminderte Verdunstung an sich, sondern die bessere Bindung die Hauptrolle.

Für die Bindung kommen in Betracht:

a) anorganische Bindung, die Bildung unlöslicher Phosphate und die Bindung durch $CO_2$,

b) solche Zerlegungen, bei denen zugleich entstehende organische Säuren die Bindung vermitteln.

Die in den Kulturflüssigkeiten erreichten $NH_3$-Ansammlungen können nach meinen Untersuchungen also sehr erhebliche werden; doch bestehen offenbar quantitative Unterschiede bei den verschiedenen Bakterienarten.

## II.

Zur Beurteilung der in der Tat aufgetretenen $NH_3$-Abspaltung genügt allein nicht die Stärke der in einer Kultur erreichten $NH_3$-Ansammlung; es bliebe dann die durch Verdunstung verloren gehende Menge unberücksichtigt, wie dies in den bisher beschriebenen Versuchen der Fall war. Wir müssen also versuchen, die Experimente noch weiter auf eine genaue quantitative Bestimmung der $NH_3$-Erzeugung im ganzen auszudehnen.

Die Verdunstung von $NH_3$ ist ein Vorgang, der in seinen Einzelheiten keineswegs völlig erkannt ist. Es kommt natürlich ganz darauf an, ob neben dem $NH_3$ noch Säuren vorhanden sind, die dieses binden. Nach dieser Richtung kann auch schon die Entwicklung von $CO_2$ bereits einen die $NH_3$-Abgabe hemmenden Faktor darstellen. Bei der Umbildung der Aminosäuren u. dgl. bleiben auch Reste von freien Säuren möglicherweise übrig, welche auf $NH_3$ bindend wirken.

Manchmal kommt auch, wie Rubner zuerst quantitativ verfolgte, die Bildung von $SO_3$ aus schwefelhaltigen organischen Stoffen in Betracht, auch $SH_2$ ändert die Flüchtigkeit des $NH_3$. Gelegentlich mögen auch Kohlehydrate unter Säurebildung zerlegt und so $NH_3$ und dessen Derivate fixiert werden. Ferner mufs ein wesentlicher Einflufs der Phosphate angenommen werden.

Die durch Verdunstung in Verlust kommende Stickstoffmenge wurde in wochenlangen Versuchsreihen bei zwei Bakterienarten, dem Bact. proteus und coli (Aue) in der Weise bestimmt, dafs nach Kjeldahl sowohl der N-Gehalt der besäten als auch der unbesäten Nährlösung festgestellt wurde, die Differenz, welche die beiden gegeneinander aufwiesen, mufste dann dem verdunsteten N entsprechen. Zu dieser Analyse wurden stets 10 ccm Flüssigkeit verwendet, die von gröfseren Mengen, welche gleichzeitig noch zu weiteren unten angeführten Untersuchungszwecken dienten, genommen wurden.

Nachstehende Tabelle gibt in absoluten Zahlen den Verlust von 50 ccm Nährlösung an den einzelnen Tagen, sie sind gewonnen aus je zwei Bestimmungen und stellen somit Mittelwerte dar. (Tab. I.)

Daraus berechne ich dann den Verlust für je einen Tag, und zwar für jede der aufgeführten Beobachtungen. (Tab. 2.)

Zur Beurteilung der Zahlen bemerke ich zunächst, dafs auf die Ergebnisse, weil sie die Resultate einer Defizitbestimmung sind, natürlich kleine Verluste bei der N-Bestimmung schon einen Einflufs gewinnen, und zwar an den ersten Tagen, wo die absoluten Werte des N-Verlustes klein sind, sind die rechnerischen Differenzen erheblicher als später.

Tab. 1. In 50 ccm Nährlösung sind (nach Kjeldahl) an Stickstoff in mg:

| Tag der Untersuchung | Vor dem Versuch | Bei dem Bact. proteus | | Bei dem Bact. coli Aue. | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | nach dem Versuch | Differenz | nach dem Versuch | Differenz |
| 1. | 180,23 | — | — | — | — |
| 2. | » | 176,63 | 3,6 | 178,87 | 1,36 |
| 3. | » | 176,73 | 3,5 | 178,19 | 2,04 |
| 4. | » | 176,83 | 3,4 | 177,51 | 2,72 |
| 5. | » | 177,11 | 3,12 | 176,93 | 3,30 |
| 6. | » | 177,51 | 2,72 | 176,15 | 4,08 |
| 8. | » | 176,83 | 3,4 | 176,15 | 4,08 |
| 10. | » | 178,08 | 1,15 | 174,83 | 5,40 |
| 12. | » | 176,83 | 3,4 | 175,45 | 4,76 |
| 14. | » | 176,15 | 4,08 | 172,83 | 7,50 |
| 16. | » | 175,47 | 4,76 | 174,11 | 6,12 |
| 18. | » | 174,83 | 5,40 | 169,81 | 11,42 |
| 20. | » | 172,78 | 7,45 | 172,73 | 7,5 |
| 22. | » | 171,38 | 8,85 | 172,07 | 8,16 |
| 24. | » | 169,38 | 10,85 | 171,43 | 8,80 |
| 26. | » | 169,98 | 10,25 | 172,42 | 7,81 |
| 29. | » | 170,31 | 9,92 | 173,43 | 6,80 |

Tabelle 2. In 24 Stunden wird an $NH_3$ verloren an Verdunstung:

| Tag | Bact. proteus | Bact. coli | Differenz v. Mittel | |
|---|---|---|---|---|
| | | | B. proteus | B. coli |
| 1. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 1,50 | 0,68 | + 1,41 | + 0,27 |
| 3. | 1,25 | 0,68 | + 0,86 | 0,27 |
| 4. | 0,85 | 0,68 | + 0,46 | + 0,27 |
| 5. | 0,62 | 0,66 | + 0,23 | + 0,25 |
| 6. | 0,48 | 0,68 | + 0,09 | + 0,27 |
| 8. | 0,43 | 0,51 | + 0,04 | + 0,10 |
| 10. | 0,11 | 0,54 | — 0,28 | + 0,13 |
| 12. | 0,28 | 0,39 | — 0,11 | + 0,02 |
| 14. | 0,26 | 0,53 | — 0,13 | + 0,12 |
| 16. | 0,26 | 0,38 | — 0,13 | — 0,03 |
| 18. | 0,30 | 0,63 | — 0,09 | + 0,22 |
| 20. | 0,37 | 0,37 | — 0,02 | — 0,04 |
| 22. | 0,40 | 0,37 | + 0,01 | — 0,04 |
| 24. | 0,45 | 0,36 | + 0,06 | — 0,05 |
| 26. | 0,39 | 0,30 | ± 0 | — 0,11 |
| 29. | 0,35 | 0,24 | — 0,04 | — 0,17 |
| Mittel | 0,39 | 0,41 | | |

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, dafs die Verluste im ganzen in beiden Reihen sehr ähnlich sind, mit Unterschieden im einzelnen.

Das Mittel des Verlustes kann man nicht durch einfache Verwendung der in der Tabelle angeführten Zahlen berechnen sondern nur, wenn man von der Summe aller Verluste ausgeht und durch die Summen der Beobachtungstage dividiert, man erhält dann 0,39 bzw. 0,41 mg N als Tagesverlust, also sehr gut stimmende Werte. Hiervon weichen die Zahlen in den Einzelperioden ab, wie Stab 4 und 5 der Tabelle erkennen lassen. Die Vorzeichen der Abweichung vom Mittel zeigen einen etwas gröfseren N-Verlust zu Anfang der Reihe als später — etwa bis zum achten Tage — das ist die Periode der Hauptentwicklung der Bakterien.

Die durch Verdunstung verlorene $NH_3$-Menge steht jedenfalls in keinem konstanten Verhältnis zum $NH_3$-Gehalt der Lösung, wie dies ja aus der sehr verschiedenen Möglichkeit der $NH_3$-Bindung eigentlich auch zu erwarten ist. Zu Anfang der Reihe mufs jedenfalls die Bildung freien $NH_3$ überwiegen.

Aufser dieser Bestimmung der Verdunstungsgröfse wurde gleichzeitig bei diesen beiden Keimen sowie bei einem weiteren Kolistamm die $NH_3$-Ansammlung in der Kulturflüssigkeit nach der Schlösingschen Methode quantitativ untersucht, und ferner bei allen drei Keimen mittels der Harnstoffbestimmungsmethode nach Hüfner der Stickstoffgehalt der Flüssigkeit, soweit er durch diese Methode nachweisbar ist, fortlaufend bestimmt; nebenher gingen Keimzahlbestimmungen der betreffenden Flüssigkeiten. Die Untersuchung nach Hüfner wurde von Herrn Oberarzt Dr. Christian ausgeführt, der mir seine Resultate in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hat.

Gröfsere Mengen Nährlösung wurden zu diesem Zweck in Flaschen besät und von diesem Vorrat täglich, wie bei den früheren Versuchen, die benötigten Mengen weggenommen, nachdem vorher durch Schütteln gründlich gemischt worden war.

Die Stickstoffbestimmung nach Hüfner geschah in folgender Weise:

Im Hüfnerschen Apparat, dessen Rauminhalt sorgfältig geeicht wurde (Quecksilberwägung) wurde eine bestimmte Anzahl Kubikzentimeter der Bouillonkultur mit starker Bromlauge zusammengebracht, das sich entwickelnde Gas aufgefangen und nach Entfernung der Lauge im Wasserbad das Gasvolumen beim Tagesluftdruck gemessen. Das gefundene Gasvolumen wurde alsdann auf 760 mm Quecksilberdruck und eine Temperatur von 0° reduziert. Um einen besseren Vergleich auch bei Anwendung verschiedener, ungleich grofser Apparate zu ermöglichen, wurden die Zahlen umgerechnet in diejenigen Gröfsen, die 1 ccm der Bouillonkultur entsprachen.

Bei der Öffnung des weitgebohrten Hahnes fiel sofort die Bromlauge in grofser Menge in die Bouillon hinein und es begann in den ersten Tagen ziemlich rasch, in späterer Zeit stürmisch die Gasentwicklung. Nach etwa 10 Minuten hatte sich der gröfsere Teil des Gases im Eudiometer gesammelt, doch dauerte die Entwicklung noch fort; eine Vermehrung der Gasmenge konnte bis zu 20 Stunden festgestellt werden. Nachher stieg zwar auch noch hin und wieder ein Gasbläschen auf, jedoch so selten, dafs ein Wachsen des Gasvolumens während mehrerer Stunden nicht mehr wahrgenommen werden konnte. Daher wurde jeder Versuch nach 24 Stunden beendet.

Bei der Behandlung mit Bromlauge geben eine Anzahl von Verbindungen ihren Stickstoff ab. In der sterilen Pferdefleischbouillon sind deren schon eine ganze Anzahl vorhanden. Vor allem sind hier wohl die Extraktivstoffe des Fleisches die Stickstofflieferanten, Guanin, Kreatin, Kreatinin etc., ferner kommen auch Spuren von Harnstoff im Fleischwasser in Betracht.

Die erste Versuchsreihe betrifft das Bact. coli (Aue), von dem ich zunächst die Originalzahlen der Ergebnisse anfüge:

(Siehe Tabelle A auf S. 22.)

Die Bakterienzahl in der Flüssigkeit schwankt im ganzen Verlauf (1.—18. Tag) zwischen 30—450 Millionen pro 1 ccm der Nährlösung. Es sind dies zwar grofse Schwankungen, aber sie besagen doch, dafs zu keiner Zeit Mangel an lebenden kulturfähigen Bakterien war. Leider können, wie dies schon mehrfach

Tabelle A.

Bact. coli (Aue).

| Tag der Untersuchung | $NH_3$-Menge in 50 ccm Bouillon in mg | Keimzahl pro ccm in Millionen | Verdunstete Stickstoffmenge aus je 10 ccm Bouill. in mg | Stickstoffgehalt nach Hüfner pro 1 ccm (nach Abzug des N in der unbesäten Bouill.) in ccm |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,125 | 450 | — | — |
| 2 | 0,425 | 170 | 0,272 | — |
| 3 | 0,425 | 95 | 0,408 | — |
| 4 | 1,275 | 280 | 0,544 | — |
| 5 | 6,375 | 150 | 0,660 | — |
| 6 | 5,525 | 160 | 0,816 | 0,2081 |
| 8 | 6,375 | 333 | 0,816 | 0,1299 |
| 10 | 5,525 | 110 | 1,088 | 0,1585 |
| 12 | 4,675 | 150 | 0,952 | 0,2292 |
| 14 | 4,675 | 65 | 1,496 | 0,2476 |
| 16 | 5,970 | 30 | 1,224 | 0,2449 |
| 18 | 5,970 | 102 | 1,904 | 0,3094 |
| 20 | 16,575 | 2235 (Bodensatz) | 1,496 | 0,4661 |
| 22 | 21,250 | 400 (Bodensatz) | 1,632 | — |
| 24 | 27,625 | — (Bodensatz) | 1,768 | 0,4851 |
| 26 | 19,125 | — (Bodensatz) | 1,564 | — |
| 29 | 25,500 | — (Bodensatz) | 1,360 | 0,6322 |
| 31 | 42,925 | — (Bodensatz) | 1,360 | 0,6322 |

betont wurde, die Keimzählungen auch keinen Anspruch auf volle Genauigkeit machen, da bei der Tendenz der Keime, sich nach und nach abzusetzen, vielfach Konglomerate sich bilden. Am 20. Tage war die Bodensatzmasse so bedeutend, dafs beim Schütteln abgelagerte Massen in der Oberhand waren, von wirklichen exakten Keimzählungen kann also dort keine Rede mehr sein. Neben kulturfähigen Keimen waren unzweifelhaft massenhaft nicht mehr entwicklungsfähige vorhanden. In diesen groben Bakterienverbänden fand sich auch weit mehr an $NH_3$-Verbindungen oder aber es erfolgte gerade in dieser Periode eine andere Art der Bindung des $NH_3$.

In den eben zu besprechenden Versuchen war neben dem Verlust an N auch die $NH_3$-Bildung und die Zerleglichkeit der Bakterienflüssigkeit durch Bromlauge bestimmt worden. Man kann daher $NH_3$-Verlust + $NH_3$ der Flüssigkeit (das präformierte

$NH_3$ ist abgezogen) als die Summe der $NH_3$-Bildung zusammenlegen und gewinnt so folgende Tabelle:

Tabelle B.

In 50 ccm der Kulturflüssigkeit (Bact. coli Aue) sind:

| Tag der Untersuchung | Stickstoff in mg | | | | von 100 N insgesamt sind: in $NH_3$ + Verlust |
|---|---|---|---|---|---|
| | aus[1]) $NH_3$ der Lösung | nach[1]) Hüfner | Verlust aus Verdunstung | aus $NH_3$ + Verlust | |
| 1 | 1,86 | — | — | 1,86 | — |
| 2 | 0,34 | — | 1,36 | 1,70 | 0,9 |
| 3 | 0,34 | — | 2,04 | 2,38 | 1,32 |
| 4 | 1,04 | — | 2,72 | 3,76 | 2,09 |
| 5 | 5,22 | — | 3,30 | 8,50 | 4,7 |
| 6 | 4,52 | 13,11 | 4,08 | 8,60 | 4,77 |
| 8 | 5,22 | 8,15 | 4,08 | 9,30 | 5,2 |
| 10 | 4,52 | 9,65 | 5,40 | 9,92 | 5,5 |
| 12 | 3,62 | 14,15 | 4,76 | 7,78 | 4,32 |
| 14 | 3,02 | 15,15 | 7,50 | 10,52 | 5,84 |
| 16 | 4,92 | 15,55 | 6,12 | 11,08 | 6,15 |
| 18 | 4,92 | 19,35 | 11,42 | 16,34 | 9,07 |
| 20 | 13,6 | 29,35 | 7,50 | 21,10 | 11,6 |
| 22 | 17,4 | — | 8,16 | 25,56 | 14,2 |
| 24 | 22,6 | 30,55 | 8,80 | 31,44 | 17,4 |
| 26 | 15,6 | — | 7,812 | 23,42 | 13,0 |
| 29 | 20,9 | 39,85 | 6,80 | 27,70 | 15,4 |

1) Der in der unbesäten Bouillon vorhandene N-Gehalt ist bereits in Abzug gebracht.

Sie zeigt, dafs in der Tat anfänglich die Verluste im Verhältnis zur Gesamtproduktion an $NH_3$ sehr grofs sind, demnach hauptsächlich wenig festgebundener $NH_3$ entsteht, im weiteren Verlauf werden sie durch Umsetzungen grofser $NH_3$-Mengen gröfstenteils zurückgehalten.

Die Gesamtleistung der $NH_3$-Abspaltung war:

in der ersten Woche . . . . . . . + 8,9 mg N

» » zweiten Woche 10,52
— 8,9
1,62 = . . + 1,62 » »

| | | |
|---|---|---|
| in der dritten Woche | 16,34 | |
| | — 10,52 | |
| bis zum 18. Tag | 5,82 = . . | + 5,82 mg N |
| in der vierten Woche, d. h. vom 18. Tage bis zum Mittel vom 24., 26. und 29. Tag | 28,10 | |
| | — 16,34 | |
| | 11,76 = . . | + 11,76 » » |

Bei Betrachtung dieser Resultate lassen sich zwei Etappen in der $NH_3$-Abspaltung unterscheiden, in der ersten und in der dritten Woche eine starke $NH_3$-Entwicklung, dazwischen sehr geringe Veränderungen, vom 20. Tage ab war der Bodensatz mit dem reichlichen Bakteriensediment zur Analyse benutzt worden und zeigte es sich, dafs hier die Quelle für eine reichere $NH_3$-Bildung sich fand. Besonders interessant ist, dafs in dem Bodensatz eine Abspaltung gröfserer Mengen nicht flüchtiger $NH_3$-Verbindungen eingetreten war, wie die Tabelle zeigt. Dies Resultat hatte übrigens auch schon die früheren Experimente ergeben, bei denen stets der ganze Inhalt der Kölbchen analysiert worden war.

Es werden sicherlich im späteren Verlauf der $NH_3$-Umwandlungen festere Verbindungen gebildet. Die Bindung an die Phosphorsäure beginnt wahrscheinlich schon frühzeitig. Zur völligen Ausfällung genügen aber die vorhandenen Alkaleszenzgrade in der ersten Zeit kaum. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dafs doch ein Teil solcher Verbindungen in den schleimig-gelatinösen Sedimenten sich ablagert und dadurch gewisse Störungen in der Gleichmäfsigkeit der Verteilung des $NH_3$ hervorruft. Noch wahrscheinlicher dürfte aber die Annahme sein, dafs tatsächlich im späteren Verlauf des Versuches reichlich tiefergehende Spaltungen organischer Verbindungen eintreten, bei denen das $NH_3$ an gleichzeitig auftretende Säuren gebunden bleibt. Auch autolytische Veränderungen absterbender Bakterien und ein Freiwerden intrazellularer Fermente ist nicht ausgeschlossen.

Die Ausbeute an $NH_3$ betrug in maximo 17,4 % des vorhandenen N.

Die Umwandlung der Stickstoffverbindungen in $NH_3$ ist aber nicht der alleinige Vorgang, den man chemisch fassen kann, vielmehr kommen auch solche Umwandlungen zustande, dafs der N durch Bromlauge leichter abgespalten wird. Bis zu 22,2 % des vorhandenen N war im Laufe des Versuches in spaltbarere Formen übergeführt. Auch dieser Prozefs ist in der späteren Zeit umfangreicher als zu Anfang des Versuches.

In einer zweiten Reihe wurde ein Bact. coli, Stamm F, verwendet. Das Bakterienwachstum verhielt sich insofern etwas anders, als von Anfang an die Zahl der Zellen rasch anstieg, aber dann recht gleichmäfsig absank, ohne dafs wegen frühzeitiger Sedimentbildung sich Unregelmäfsigkeiten zeigen.

Tabelle C.

(Bact. coli (F).

| Tag der Untersuchung | $NH_3$-Menge in 50 ccm Bouillon in mg | Keimzahl pro 1 ccm in Millionen | Stickstoffgehalt nach Hüfner pro 1 ccm nach Abzug des N in der unbesäten Bouillon in ccm |
|---|---|---|---|
| 1 | 1,275 | 731 | 0,2187 |
| 2 | 2,550 | 215 | 0,2351 |
| 3 | 2,125 | 120 | 0,2194 |
| 4 | 1,275 | 209 | 0,2189 |
| 5 | 0,425 | 121 | 0,2455 |
| 6 | 2,550 | 448 | 0,2790 |
| 8 | 0,425 | 379 | 0,3129 |
| 10 | 2,125 | 379 | 0,3479 |
| 12 | 2,550 | 212 | 0,4373 |
| 14 | 2,125 | 138 | 0,4748 |
| 16 | 6,800 | 40 | 0,5546 |
| 18 | 9,775 | 100 | 0,6129 |
| 20 | 6,800 | 80 | 0,8189 |
| 22 | 19,125 | 60 | — |
| 24 | 19,578 | 41 | — |
| 26 | 21,705 | 55 | — |
| 29 | 34,450 | 61 | — |
| 31 | 34,000 | 80 | — |

Tabelle D.

In 50 ccm der Kulturflüssigkeit (Bact. coli F) sind:

| Tag der Untersuchung | Stickstoff in mg | |
|---|---|---|
| | aus $NH_3$ der Flüssigkeit | nach Hüfner |
| 1 | 1,18 | — |
| 2 | 2,12 | 13,80 |
| 3 | 1,78 | 14,80 |
| 4 | 1,02 | 13,82 |
| 5 | 0,357 | 13,81 |
| 6 | 2,12 | 15,46 |
| 8 | 0,357 | 17,57 |
| 10 | 1,78 | 19,66 |
| 12 | 2,12 | 21,90 |
| 14 | 1,78 | 27,55 |
| 16 | 5,78 | 29,85 |
| 18 | 8,24 | 34,93 |
| 20 | 5,78 | 38,61 |
| 22 | 16,23 | 51,59 |
| 24 | 16,57 | — |
| 26 | 18,44 | — |
| 29 | 29,24 | — |
| 31 | 22,90 | — |

Die $NH_3$-Ansammlung ist gleichmäfsig fortschreitend, von der dritten Woche ab findet ein steiles Anwachsen statt, auch die Hüfnersche Methode zeigt die fortschreitende Zerlegung der N-haltigen Substanzen, wie im vorigen Versuch. Daraus folgt auch, dafs die Sedimentierung im vorigen Experiment allein das Anwachsen des gebundenen $NH_3$ in der Hüfnerschen Zahl nicht erklärt. Weiterhin kann man aus dem Ergebnis schliefsen, dafs jedenfalls der Zahl der kulturfähigen Keime allein der Grad der Ammoniakbildung nicht entspricht. — Die verdunstete $NH_3$-Menge wurde in diesem Fall nicht bestimmt.

Eine den bei den Kolistämmen ganz analoge Untersuchung wurde mit dem Proteus vulgaris ausgeführt. (Tab. E.)

Auch hier waren während der ganzen Versuchszeit reichlich kulturfähige Bakterien vorhanden. In der vierten Woche, vom 25. Tage ab, war der Flüssigkeitsvorrat soweit erschöpft, dafs

Tabelle E.

| Tag der Untersuchung | $NH_3$-Menge in[1]) 50 ccm der Bouillon in mg | Keimzahl pro ccm in Millionen | Verdunstete Stickstoffmenge aus je 10 ccm Bouillon in mg | Stickstoffgehalt nach Hüfner pro 1 ccm Bouillon reduziert auf 0° und 760 mm Druck[1]) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,850 | 190 | — | — |
| 2 | 4,675 | 90 | 0,720 | — |
| 3 | 1,275 | 75 | 0,700 | — |
| 4 | 9,350 | 185 | 0,680 | — |
| 5 | 0,850 | Platten verflüssigt | 0,624 | — |
| 6 | 1,700 | 230 | 0,544 | 0,1449 |
| 8 | 3,825 | 525 | 0,680 | 0,1829 |
| 10 | 4,675 | 570 | 0,272 | 0,2119 |
| 12 | 9,780 | 115 | 0,680 | 0,3346 |
| 14 | 5,100 | 120 | 0,816 | 0,3769 |
| 16 | 13,175 | 135 | 0,952 | 0,4169 |
| 18 | 16,575 | 308 | 1,088 | 0,3959 |
| 20 | 16,150 | 298 | 1,496 | 0,4883 |
| 22 | 18,700 | 368 | 1,770 | — |
| 24 | 26,200 | 490 | 2,170 | 0,5430 |
| 26 | 29,325 | — starker Bodensatz | 2,050 | — |
| 29 | 40,375 | — starker Bodensatz | 1,924 | 0,8442 |
| 31 | 39,525 | — starker Bodensatz | — | — |
| 34 | 46,750 | — starker Bodensatz | — | — |

nunmehr der mächtige Bodensatz hätte zu den Bakterienzählungen verwendet werden müssen, was aber weiteres Interesse nicht bot.

Die Untersuchung auf $NH_3$ gab folgende Resultate:

(Siehe Tabelle F auf S. 28.)

Der $NH_3$-Verlust war auch hier zu Beginn der Reihe verhältnismäfsig sehr grofs, während nur wenig nichtflüchtige Verbindungen sich bilden, späterhin ist es gerade umgekehrt, es entsteht bis dreimal so viel nichtflüchtiges $NH_3$ gegenüber dem leichtflüchtigen.

1) In Abzug gebracht ist die in der unbesäten Bouillon nachweisbare Menge.

Tabelle F.

In 50 ccm der Proteusbouillon sind in mg:

| Tag der Untersuchung | Stickstoff | | | | Von 100 N insgesamt sind in $NH_3$ + Verlust |
|---|---|---|---|---|---|
| | aus $NH_3$ | nach Hüfner | Verlust | aus $NH_3$ + Verlust | |
| 1 | 0,723 | — | — | — | — |
| 2 | 3,97 | — | 3,60 | 7,57 | 4,2 |
| 3 | 1,08 | — | 3,50 | 4,58 | 2,5 |
| 4 | 7,95 | — | 3,40 | 11,35 | 6,8 |
| 5 | 0,723 | — | 3,12 | 3,848 | 2,13 |
| 6 | 1,44 | 9,128 | 2,72 | 4,16 | 2,31 |
| 8 | 3,247 | 11,523 | 3,40 | 6,647 | 3,69 |
| 10 | 3,97 | 13,349 | 1,15 | 5,12 | 2,84 |
| 12 | 8,31 | 21,079 | 3,40 | 11,71 | 6,62 |
| 14 | 4,33 | 23,634 | 4,08 | 8,41 | 4,67 |
| 16 | 11,19 | 26,264 | 4,76 | 15,95 | 9,97 |
| 18 | 14,08 | 23,841 | 5,40 | 19,48 | 10,8 |
| 20 | 14,06 | 30,762 | 7,45 | 21,51 | 11,95 |
| 22 | 15,85 | — | 8,85 | 24,70 | 13.16 |
| 24 | 22,27 | 34.22 | 10,85 | 33,12 | 18,4 |
| 26 | 24,92 | — | 10,25 | 35,17 | 19,5 |
| 29 | 34,25 | 53,184 | 9,92 | 44,17 | 24.5 |
| 31 | 33,57 | — | — | — | — |
| 34 | 39,69 | — | — | — | — |

Die Menge des entstandenen $NH_3$ läfst sich wie folgt berechnen:

Für die 1. Woche . . . . . . . . . . 5,4 mg N

» » 2. » (Mittel aus 12. + 14. Tag) $10{,}1 - 5{,}4 = 4{,}7$ » »

» » 3. » . . . . . . . . . . $23{,}1 - 10{,}1 = 13{,}0$ » »

» » 4. » . . . . . . . . . . $44{,}17 - 23{,}1 = 21{,}07$ » »

Die Ammoniakbildung war etwas gleichmäſsiger als bei dem Bact. coli, besonders tritt die tiefe Einsenkung in der zweiten Woche hier nicht so zutage wie bei ersterem; auch die letzte Periode zeigt einen starken Anstieg.

Im ganzen wurden 24,5% des N in $NH_3$ übergeführt. Desgleichen zeigen auch die Zahlen der Analyse nach Hüfner zum Schluſs ein stärkeres Ansteigen.

Es ist also bewiesen, daſs die Art der $NH_3$-Abspaltung in den einzelnen Perioden verschieden ist; sie ist späterhin bei den saprophytischen Keimen sogar recht bedeutend besonders dann, wenn starke Neigung zum Sedimentieren eintritt. In diesem Stadium findet man reichlich gebundenes $NH_3$. Auch in anderer Beziehung, abgesehen von der $NH_3$-Bildung, zeigen sich die N-haltigen Nährstoffe verändert, wie ihre leichtere Spaltbarkeit durch Bromlauge erweist.

## III.

Nachdem sich gezeigt hat, daſs die $NH_3$-Erzeugung nicht von der Kulturfähigkeit der Zellen allein abhängig ist, sondern daſs hierbei auch die ohne Vermehrungsfähigkeit weiter lebenden Zellen beteiligt sind, erübrigt noch der Nachweis rein fermentativer Spaltungsvorgänge.

Zu diesem Zwecke wurden zunächst zwei Versuchsreihen, die eine mit gewöhnlicher Bouillon, die andere mit Bouillon und 1% Traubenzucker ausgeführt.

In zwei Kolben mit gleichen Mengen Bouillon, davon eine mit 1% Traubenzucker, wurden 169080 Keime des Bact. proteus ausgesät; nach 24 Stunden betrug die Keimzahl in der gewöhnlichen Nährlösung 492543800, in der mit Zuckerzusatz 371245700 Keime in 1 ccm. Dann wurden durch Zusatz von ca. 125 ccm Toluol zu jeder Nährlösung die Bakterien abgetötet wie durch Kontrollen festgestellt wurde. Während der ganzen Versuchsdauer wurde die Reaktion geprüft; bei der Bouillon ohne Zucker war sie anfänglich schwach sauer, wurde jedoch bald alkalisch und diese Alkaleszenz nahm mit der Zeit erheb-

lich zu, die Traubenzuckerlösung zeigte zurzeit der Abtötung und kurz nach der Abtötung neben starker Gasbildung eine **kräftig** saure Reaktion, die sich nach und nach bis zur schwach alkalischen abstumpfte. Die Menge $NH_3$, **die während der ersten 24 Stunden, als noch die lebenden Keime in der Flüssigkeit vorhanden waren, gebildet wurde, war bei beiden Lösungen fast dieselbe, sie betrug 4,25 mg mehr als in der unbesäten vorhanden war.** Das ist immerhin ein Vorgang, der Beachtung verdient, indem er uns zeigt, dafs durch die Säurebildung aus Zucker jedenfalls die $NH_3$-Abspaltung nicht gehemmt war.

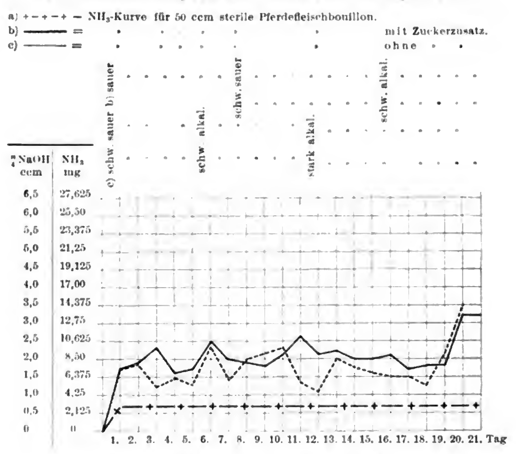



Fig. G. Ammoniakbildung beim Bact. Proteus nach Abtötung durch Toluol.

Die Versuche beweisen mit aller Sicherheit, dafs $NH_3$ auch ohne die gleichzeitigen Lebensvorgänge etwa auf fermentativem Wege entstehen kann, da von Anfang an etwas Säuregehalt in beiden Fällen sich zeigte, also $NH_3$-Verluste nicht eingetreten sind,

so haben wir einen quantitativ sich aussprechenden Zuwachs an $NH_3$, der dann später in einen geringen Verlust überleitet, nachdem die Lösungen schwach alkalisch geworden waren.

Die Steigung der $NH_3$-Menge am Ende des Versuchs wurde erhalten, als auch der Bodensatz der Flüssigkeit mit verarbeitet wurde. Ursache hierfür gibt entweder der Umstand, dafs die Bakterienleiber natürlich auf die anliegenden Nährstoffe leichter fermentativ wirken können oder auch in der Ausfällung von Trippelphosphat, was bei der stark alkalischen Reaktion nicht auffällig war.

In einem weiteren, nur orientierenden Versuch wurde der Rasen von ca. 15 Proteus-Schrägagarkulturen, nachdem mittels Azeton die Keime abgetötet waren, in ca. 800 ccm steriler Bouillon geschüttet. Das Gewicht des nach Verdunsten des Azetons staubtrockenen Rasens betrug 0,093 g. Die $NH_3$-Bestimmung sowie der Stickstoffnachweis nach Hüfner ergeben folgende Resultate:

| Tag der Untersuchung | Menge $NH_3$ in 50 ccm der Bouillon in mg[1]) | Stickstoffgehalt nach Hüfner pro 50 ccm in mg[1]) |
|---|---|---|
| 1 | 2,125 | 7,41 |
| 3 | 0,850 | 8,744 |
| 5 | 2,450 | 16,822 |
| 7 | — | 8,498 |
| 9 | 0,85 | 2,123 |
| 11 | 1,275 | — |
| 13 | 0,85 | — |

Die $NH_3$-Entwicklung ist am ersten Tage schon ziemlich erheblich, wobei man allerdings nicht vergessen darf, dafs 15 Agarkulturen verwendet worden sind. — Auf das richtige Mafs reduziert, wird man sagen dürfen, die fermentative Zerlegung spielt bei der $NH_3$-Bildung zwar mit, sie steht aber doch sehr in zweiter Linie.

Es ist möglich, dafs in diesem Versuch das Ausfallen von Trippelphosphat mitspricht, da diese Kristalle auch nach gutem

1) Nach Abzug der präformierten Menge.

Schütteln leicht zu Boden fallen. Das würde gewisse Ungleichheiten des $NH_3$-Vorkommens verständlich machen. Mit dem Wachstumsprozeſs selbst hat die $NH_3$-Bildung keinerlei Zusammenhang, sie ist vielmehr ein Stoffwechselvorgang.

Herrn Geheimrat Rubner spreche ich für die liebenswürdige Unterstützung bei dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank aus.

# Über die Ernährung einiger Spaltpilze in peptonhaltigen Nährböden.

Von

Dr. **Nawiasky**,

früherem Assistenten am hygienischen Institut.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner.)

## Einleitung.

Unter den gewöhnlichen, im täglichen Leben häufig beobachteten Vorgängen nahm zu allen Zeiten die Fäulnis eine hervorragende Rolle ein, schon zu der Zeit, als sich die Medizin in den Uranfängen befand und man weder über die Ursache der Fäulnis noch auch über die Natur der zu spaltenden Stoffe irgendwelche Vorstellungen besafs.

Die Liebigsche Theorie suchte später eine rein chemische Erklärung der Vorgänge wahrscheinlich zu machen und verlegte das Zersetzungsvermögen in die sich umwandelnden Eiweifsstoffe. Die vitale Auffassung von Fäulnis und Gärung trug aber mit dem Aufblühen der mikrobiologischen Forschung den Sieg davon.

Als man mit Sicherheit wufste, dafs bei der Fäulnis stets Mikroorganismen anwesend sind, und dafs die Produkte der Fäulnis wesentlich in einer Veränderung der eiweifsartigen Stoffe und ihrer Derivate bestehen, glaubte man, sie einfach als die Zersetzung solcher Körper durch Mikroben bezeichnen zu dürfen.

Bacterium termo sollte an allen solchen Prozessen in erster Linie beteiligt sein. Mit der tieferen bakteriologischen Erkenntnis und der genaueren chemischen Analyse wurde der zuerst sehr einheitlich und schematisch aufgefafste Fäulnisprozefs nur verwickelter. Die Unitätstheorie wurde unhaltbar, an Stelle einer Bakterienspezies traten in der bakteriologischen Ära Dutzende von Fäulnisorganismen, und die Spaltung von Eiweifs und dessen Derivaten lieferte Produkte und Erscheinungen, die nur sehr locker mit Fäulnisprozessen in Einklang zu bringen waren.

So schied schliefslich der Begriff Fäulnis aus den wissenschaftlichen Definitionen wieder aus und ist schliefslich eine praktisch freilich nicht entbehrliche Bezeichnung für bakterielle Zersetzungen von Eiweifs, dessen hyrolytischen Spaltprodukten und von Extraktivstoffen geblieben, bei welchen unter mehr oder minder vollkommenem Ausschlufs des Luftsauerstoffs stinkende Spaltungsprodukte geliefert werden.

Ist somit das wissenschaftliche Streben, die Fäulnis zu definieren, auch als gegenstandslos verlassen, so wird doch gerade das Studium der Spaltung N-haltiger organischer Stoffe durch Bakterien als eine wichtige Aufgabe bezeichnet werden können.

Auch in dieser Hinsicht wird man nicht gerade über einen Mangel an Literatur klagen können, ein grofser Teil der Experimente, welche mit Bakteriengemischen aller Art angestellt wurde, hat aber heute kaum mehr als historisches Interesse, wenigstens für den Biologen, der mit quantitativen Vorstellungen zumeist operieren mufs.

Die Erklärung der Umsetzung der Eiweifsstoffe und ihrer Derivate hat aber trotz der vielen vergeblichen Anläufe nichts von ihrer Bedeutung eingebüfst. Wir haben allen Grund zur Annahme, dafs die überwiegende Masse der Bakterienspezies die N-haltigen Stoffe in ihrem Lebensprozefs verwendet. Sie hat zunächst rein biologisches Interesse im Hinblick auf die Zellphysiologie, aber auch ihre Bedeutung für die Ausbildung einer wissenschaftlichen Methodik für die Herstellung der Nährböden und die Erklärung der pathogenen Eigenschaften.

An Stelle der verschwommenen Experimente über die Fäulnis mufs also das Studium der Bedeutung der N-haltigen Stoffe in der Ernährung der Mikroorganismen treten; dabei müssen aber tunlichst alle Gesichtspunkte eines geordneten Ernährungs- und Stoffwechselexperiments berücksichtigt werden.

Jedes Ernährungsexperiment mufs ausgehen von der Kenntnis der Menge der in Aktion tretenden lebenden Wesen. Die Leistung ist in erster Linie eine Funktion der lebenden Substanz.

Gerade die einfachste und elementarste Anforderung ist in den einschlägigen Fragen fast zumeist ganz und gar vernachlässigt worden. So hat man oft schon von der Bildung spezifischer Stoffwechselprodukte gesprochen.

Ein einfacher Vergleich zweier Kulturen, wie sie vielfach in dem Gedanken, Unterschiede in der Ernährung zu finden, angestellt worden sind, ist für die Frage spezifischer Umsetzungskräfte unverwertbar, weil die Masse wirksamer Substanz dabei unbekannt bleibt. Die einfache bakterielle Auszählung ist dabei nicht zu verwenden. Eine für viele Fälle anwendbare Methode zur Feststellung der Ernten ist von Rubner vor einigen Jahren angegeben worden (Arch. f. Hyg., XVI, S. 78 u. ebenda, Bd. XLVIII, S. 299).

Die Zählmethode versagt vielfach wegen des Aneinanderklebens der Individuen, aber auch der Verlust der Wachstumsfähigkeit auf künstlichen Nährböden ist nach Rubner kein Beweis des Abgestorbenseins und der stofflichen Inaktivität.

Man mufs unter solchen Bedingungen arbeiten, dafs grofse Ernten erzielt werden, weil nur dann die Fehler ausgeschlossen werden können, die von zufälligen Verunreinigungen der Nährstoffe herrühren. Ernten, die vielen Tausenden von Keimen im Kubikzentimeter Nährlösung entsprechen, sind oft durch Unreinheiten selbst chemisch reinst dargestellter Substanzen bedingt.

Wir haben weiter vom biologischen Standpunkte die Zeit, innerhalb welcher solche Produkte entstehen, als etwas Wesentliches zu betrachten, denn die in einer Zeiteinheit vollbrachten Leistungen sind wesentlich für ihre biologische Bewertung. Je

intensiver die Produktion gewisser Spaltprodukte ist, um so sicherer ist ihre Bedeutung für die Ernährung der Mikroben.

Im Lebensprozeſs der Ernährung der Bakterien haben wir zunächst nichts anderes zu erwarten, als was sonst die Ernährung von Organismen als prägnante Eigentümlichkeiten an sich trägt.

Rubner hat zuerst die Bakterienernährung vergleichend physiologisch betrachtet.

Im Bakterienstoffwechsel haben wir, wie auch sonst in der Ernährungsphysiologie, zwischen Nutritionsvorgängen — (dem Wachstum) und den Dissimulationsvorgängen (dem Umsatz) zu unterscheiden.

Die bekannteren der »Gärungen« sind — von einigen steht es bereits sicher — Vorgänge des Stoffumsatzes; sie prägen sich nur dadurch als etwas Besonderes aus, weil wir in manchen Fällen diese Gärprodukte (Alkohol, Säuren) leicht bestimmen können, und weil speziell durch den Umstand, daſs es N-freie Gruppen sind, welche zerlegt werden können, dieser Stoffwechsel sich klar und scharf vom Wachstum und der Bildung lebender Substanz scheidet.

Die Vorgänge der Dissimulation sind, wie Rubner zuerst dargetan hat, bei Bakterien, auch dort, wo ungeklärte Zersetzungsgleichungen zugrunde liegen, kalorimetrisch nachzuweisen, und gröſser und mächtiger als die Nutritionsvorgänge (Arch. f. Hyg., LVII, S. 193). Bei vielen bis jetzt untersuchten Bakterien ist der Umsatz energetisch genau so wie bei den Tieren, d. h. es findet eine Wärmeentwicklung statt.

Angaben über das Vorkommen der Verwertung fremder Energie durch Bakterien, wie bei den grünen Pflanzen, sind in neuerer Zeit wieder fraglich geworden und waren nie genauer messend untersucht worden.

Die meisten Prozesse werden nach dem ersteren Schema einen Abbau, eine Dissimulation hervorrufen, wie diese bereits von Rubner näher gemessen ist (a. a. O. S. 193.)

Das chemische Studium des Abbaues dieser thermisch in ihren Gesamtwirkungen wenigstens scharf zu fassenden Umsetzungen begegnet nur deswegen gröſseren Schwierigkeiten, weil es uns noch an leicht auszuführenden und genauen

Trennungsmethoden der Spaltstücke der N-haltigen Nährsubstanzen fehlt. Die Erkenntnis aber gerade dieses Abbaues der N-haltigen Stoffe hat wegen der pathogenen Keime, die im Tierleib wuchern, besonderes Interesse.

Die von N-haltigen Nährstoffen ausschliefslich lebenden Organismen unterscheiden sich von der Bierhefe z. B. nur dadurch, dafs diese einen für das N und die Kohlehydraternährung scharf getrennten Stoffwechsel hat, während für die Bakterien, welche von organischen N-haltigen Körpern leben, das gleiche Ernährungsmaterial — für alle Zwecke benutzt wird.

Man könnte daher nach Rubner die einen Organismen monotrophe, die anderen ditrophe nennen, doch betrifft diese Benennung eben nur im grofsen und ganzen die Gruppierung der Nahrungsstoffe in N-haltige und N-freie, es bleibt aber natürlich die Frage offen, ob etwa zur Erhaltung des N-Verlustes (Wiederersatz) und zur eigentlich energetischen Wirkung nicht doch differente Nahrungsstoffgruppen verwendet werden müssen, welche zwar N-haltig, aber von anderer Konstitution als die Nutritionsstoffe sind.

Inwieweit wirklich monotrophe Ernährungsprozesse vorkommen und Verschiedenheiten hiervon, ist für Bakterien durch eingehende überzeugende Versuche nicht erwiesen.

In allen Fällen haben wir in dem Wachstum im engeren Sinne einen Prozefs, in welchem N-haltige Stoffe unentbehrlich sind.

Über diejenigen Stoffgruppen, welche für das Wachstum und diejenigen, welche dem Umsatz dienen, wissen wir zurzeit gar nichts Bestimmtes, da keinerlei quantitative Experimente ausgeführt worden sind.

Der Umsatz ist bei einigen näher untersuchten Bakterien quantitativ der umfangreichere Prozefs in den Ernährungsvorgängen.

Generelle Gesetze über die chemische Anforderung an Stoffen, welche für das Wachstum geeignet sind, kennen wir nicht, zweifellos sind viele ältere Angaben reformbedürftig, insoweit man blofs qualitativ das »Wachstum« auf irgendwelche Nährböden als entscheidend für die Brauchbarkeit zum Aufbau der Zellen

ansah. Wie schon erwähnt, ist die mikroskopische Methode wegen der unvermeidlichen Verunreinigungen des Präparats, aus denen die Nährböden hergestellt werden, unsicher, weil diese kleinen Ernten ebensowohl aus der bekannten Substanz eines Nährbodens, wie aus der unbekannten Substanz einer Verunreinigung herrühren können. So erklärt es sich auch, dafs man Nährböden empfohlen hat, die, wenn sie wirklich aus den Bestandteilen zusammengesetzt gewesen wären, die man angab, wegen des völligen Mangels an S gar kein Wachstum hätten geben können.

Man kann also unsicher sein, inwieweit Synthesen aus Ammoniak vorkommen. Sicher ist die Brauchbarkeit von Peptonen, Stoffen, die in den Extrakten der Organe vorhanden sind, zum Aufbau des Eiweifses der Bakterien.

Bei Proteus findet man in Fleischextrakt so viel an Bakterienmasse, dafs deren N nicht aus den Albumosen des Extraktes stammen kann. Dies ergibt sich auch aus den Untersuchungen über die Rolle der schwefelhaltigen Stoffe in Organextrakten, in denen über 40% Schwefel in der Ernte erscheint, obschon als Peptone und ähnliches nur bescheidene Anteile verfügbar sind (Rubner, Arch. f. Hyg XVI, S. 78).

Die N-haltigen und S-haltigen Gruppen treten in den Bakterien in anderen Relationen, als sie im Extrakt enthalten sind, zusammen und beweisen die synthetische Aneinanderfügung.

Derartige Prozesse des Aufbaus aus Spaltstücken des Eiweifses haben um so weniger Befremdendes an sich, als ja Synthesen aus einfacheren Materialien bei Pilzen bekannt sind, und bei der Hefe in wenigen Stunden die autolytisch gelösten Spaltstücke sich wieder vereinigen können.

Eine Unterfrage von Bedeutung wäre es, festzustellen, inwieweit bei den zum Wachstumsprozesse selbst nötigen Stoffverschiebungen Abfallkörper sich bilden.

Dieser Gedanke ist um so berechtigter, je weiter die Nahrungssubstanzen vom »Eiweifs« abstehen; zum mindesten würden doch Wassermoleküle abgespalten werden; ob darüber hinaus $CO_2$, $NH_3$, $SH_2$ und ähnliches als »Abfall« abgetrennt wird,

ist nicht erwiesen, weil eben auf diesem Gebiete überhaupt noch wenig feststeht, aber doch nicht wahrscheinlich, weil wenigstens $NH_3$ und $SH_2$ Bestandteile führen, die für den Zellaufbau oft nur schwierig beschafft werden können und ausgewertet werden müssen.

Mit dem Wachstumsprozeſs selbst, d. h. dem Ansatz, ist die Abstoſsung S-haltiger Gruppen als $SH_2$ nicht verbunden, das kann durch Versuche in einzelnen Fällen als bewiesen erachtet werden. Es bedarf aber gerade diese Frage weiterer Bearbeitung.

Das weitere Eindringen in den Stoffwechsel der Bakterien mit quantitativen Methoden kann nach dem Gesagten als ein dringendes Bedürfnis anerkannt werden. Ein systematisches Vorgehen wird noch mangels der fehlenden Erkenntnis über die Natur der Nahrungsstoffe der Bakterien ganz unmöglich. Die erste Aufgabe muſs sonach darin bestehen, in gröſseren Umrissen eine Feststellung der etwa verwendeten Nahrungsstoffgruppen zu finden.

Dies kann in zweierlei Weise geschehen, indem man einerseits die Aufzehrung von Stoffen auf verschiedenen Nährböden mit dem Nahrungsvorrat vergleicht, oder indem man die Endprodukte miſst, oder beide Vorgänge zusammen verfolgt.

Leider ist es ziemlich unbestimmt, welche Nahrungsstoffgruppen für die Umsetzungen in Anspruch genommen werden; es ist glaublich, daſs Eiweiſsstoffe selbst, Peptone, aber auch Spaltstücke dieser, die sehr zahlreich sein können, dazu dienlich sind. Von Endprodukten der Zersetzung eiweiſsartiger Stoffe und deren Spalt- und Umwandlungsprodukten (Extraktivstoffen) kann zunächst $SH_2$ oder selbst durch sekundäre Umwandlung $SO_4 H_2$ in Betracht kommen, wie Rubner, Stagnitta-Balistreri und Morris gezeigt haben.

Keineswegs zeigen alle Keime in organischen Nährsubstanzen $SH_2$-Bildung, wie Peter und Maſsen angegeben haben; es würde ein solches Vorkommen auch biologisch schwer verständlich sein, da zweifellos der Bakterienstoffwechsel der letzte unter allen Lebewesen ist, der nach einem Schema abläuft. Ja auch mit der üblichen Stufenleiter, daſs Eiweiſsstoffe die besten, Peptone

die weniger guten, noch einfachere Spaltstücke schlechte Nährstoffe seien, und in ähnlicher Stufenfolge Endprodukte, z. B. $SH_2$ lieferten, mufs man brechen.

Proteus liefert in sehr eiweifsreichen Böden z. B. keinen $SH_2$, aber sofort, wenn er in Extraktivstoffe (Fleisch) ausgesät wird.

Dafs im Stoffwechsel stets etwas S-haltige Stoffe verbraucht werden, dafür spricht manches, wenn es auch für Bakterien noch nicht bewiesen ist; aber es braucht nicht angenommen zu werden, dafs deshalb auch ein steter Verlust von S, an H gebunden, aus der Zerstörung der lebenden Substanz (Abnutzungsquote) fliefsen mufs.

Merkaptane treten neben $SH_2$ offenbar selten in grofsen Mengen auf, leicht gelingt der positive Nachweis bei Proteus.

Es ist sehr wohl möglich, dafs es auch bei Bakterien ähnliche Organismen gibt wie die Hefe, in deren Stoffwechsel die Bildung von $SH_2$ gar keinen Platz hat. Bei Bac. mycoides hat Rubner gezeigt, dafs hier aufser dem Ansatz von Schwefel überhaupt kein Abbau in nennenswerten Gröfsen vorkommt.

Aber auch für Fälle, in denen Spaltprodukte des Eiweifses den ganzen Stoffwechsel bestreiten, ist es sehr wohl denkbar, dafs die Zersetzungskraft für S-haltige Stoffe fehlen kann.

Wir müssen doch mit der Möglichkeit rechnen, dafs auch »Gärungen« von bestimmten, eng begrenzten Polypeptidgruppen u. a. anderweitigen Stoffgruppen vorkommen.

So wichtig der S als Element des Aufbaus sein mufs, so ist er doch als Abfallprodukt quantitativ, falls es nicht etwa spezifische Organismen gibt, die nur solche Stoffe für die Zersetzung auslösen, schon wegen der geringen Menge, in welcher die S-haltigen Gruppen vorkommen, von geringerer Bedeutung.

Es gibt aber auch noch wichtige andere Produkte bei den Umsetzungen, die man als Endprodukte anzusehen gewöhnt ist.

Von der aromatischen Gruppe der Eiweifsstoffe und Peptone bleibt nicht selten Indol zurück, viel häufiger, als bis vor kurzem angenommen wurde (Morris a. a. O. S. 309).

Auch mit dieser Gruppe wird man im allgemeinen erwarten dürfen, nur einen beschränkten Teil von Umsetzungen kennen

zu lernen, da die Muttersubstanzen für diese Körper im Eiweifsmolekül, also auch in den Spaltprodukten, in recht mäfsigem Anteil vertreten sind.

Quantitativ am wichtigsten erscheint die Umwandlung der N-Verbindungen durch die Endprodukte, welche das Element N einschliefsen.

Sicher ist Ammoniak (oder dessen Verwandte) ein Endprodukt der Zerlegung N-haltiger organischer Stoffe; es ist auch aus thermochemischen Gründen wahrscheinlich, dafs dieser Abspaltung in energetischer Hinsicht eine wichtige Bedeutung zukommt.

Nach den Untersuchungen, welche Berghaus im hiesigen Institute hinsichtlich der Bildung von $NH_3$ und dessen Derivaten in Peptonbouillon angestellt hat, ist diese Spaltung offenbar bei vielen Bakterien, wenn auch in verschiedener Intensität vorhanden. Sie ist keineswegs überall durch eine alkalische Reaktion der Kulturflüssigkeit zu erkennen, es ist vielmehr die quantitative exakte Analyse des ganzen Nährbodens hierzu erforderlich.

Vielfach benutzte man für die Beurteilung der Alkalibildung nun das Auftreten der Verfärbung eines Indikators wie Lackmus u. dgl. oder die Titration des Nährbodens.

Auf diesem Wege kann man aber keine Auskunft über die »Alkalibildung« erlangen, da in Nährböden $NH_3$-Abspaltung und Säuerung doch nebeneinander vorkommen können. — Dies gilt besonders von zuckerhaltigen Nährböden, die aufserdem reich an N-haltigen Nährstoffen sind. Will man die Alkalibildung kennen lernen, so mufs man dieselbe auch direkt durch Analyse feststellen, wie dies im hiesigen Laboratorium durch Berghaus geschehen ist.

Wir haben ein Recht zur Annahme, dafs die Loslösung von $NH_3$ eine sehr häufig eintretende Reaktion ist, deren Bewertung vom energetischen Standpunkt allerdings keine einheitliche sein kann. Jedenfalls ist in N haltigen Nährböden das Ammoniak das wichtigste Endprodukt.

Auf Grund dieser allgemeinen Erwägungen wurde zunächst der Versuchsplan entworfen.

Die Ernährung der Bakterien zeigt zweifellos zwei verschiedene Schemata:

a) Ernährung in N-haltigen Nährböden allein;

b) Ernährung in kohlehydratführenden Medien.

Es ist ganz gewifs, dafs manche Bakterien sowohl in dem einen wie in dem anderen Nährgemisch leben können, und es ist wahrscheinlich, dafs es sich dabei um »Nahrungsstoffvertretungen« handelt; daher die »fäulniswidrige Kraft« der Kohlehydrate.

Die Art der Umwandlung in letztere ist in einer grofsen Anzahl von Fällen durch Gosio im hiesigen Laboratorium untersucht worden. Das Schwergewicht ruht daher noch auf der Untersuchung der Ernährungsverhältnisse auf N-haltigen Nährböden.

Es sollte ein Nährboden verwendet werden, der, wenn auch ziemlich kompliziert, doch durch die chemische Analyse eine Gruppierung der Nährstoffe erlaubt, und zugleich sollten die quantitativen Bestimmungen einiger wichtiger Endprodukte ermöglicht werden. Gleichzeitig war die Feststellung der Erntemenge unabweislich.

## Methodisches.

Zur Verwendung gelangte Fleischextrakt, direkt aus Fleisch hergestellt, dem sodann noch Wittes Pepton und Kochsalz zugesetzt wurde, also — Peptonbouillon — wie sie für bakteriologische Zwecke vielfach benutzt wird. Natürlich mufste auch die Alkalisierung vorgenommen werden.

Die Nährlösung (200 ccm) wurde nach dem Sterilisieren geimpft und bei 34—35° im Brutschrank gehalten und in bestimmten Intervallen (10, 20, 30 Tage.) die Untersuchung vorgenommen. Es wurden jedesmal Kontrollversuche gemacht, und die Mittelzahlen, von denen grofse Abweichungen nicht vorkamen, als Endwerte in Rechnung gesetzt.

Der Gang der Untersuchung war folgender:

Die Nährlösung wurde zunächst mit Essigsäure angesäuert und mit Eisenazetat durch einstündiges Erhitzen im Dampftopf gefällt, sodann die Flüssigkeit zum ursprünglichen Gewicht mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Nach dem Abzentrifugieren und zweimaligen Auswaschen mit destilliertem Wasser wurde in dem Niederschlag der Stickstoff bestimmt und als Bakterienstickstoff in Anrechnung gebracht.

In der nach der Fällung über dem Niederschlag stehenden Flüssigkeit wurde der N nach Kjeldahl bestimmt.

Die Summe Bakterien-N + Reststickstoff (der Flüssigkeit) gab den Gesamt-N, zieht man diesen vom Anfangs-N-Gehalt ab, so kann ein etwa vorhandenes N-Defizit als Verlust durch flüchtige Ammoniumbasen in Rechnung gestellt werden.

Aufserdem wurden in der Stammlösung, wie in der von Bakterien befreiten Flüssigkeit durch Fällung mit Zinksulfat die Albumosen abgeschieden und im Niederschlag (nach Auswaschen mit gesättigter Zinksulfatlösung) nach Kjeldahl der »Albumosen-N« eruiert.

Eine andere Probe wurde mit Phosphorwolframsäure behandelt. Je 60 g der Lösung wurden durch verdünnte Schwefelsäure auf einen Gehalt, entsprechend einer $1\frac{1}{2}$ normalen Säure, gebracht und mit 100 ccm der offizinellen Phosphorwolframsäure gefällt. Nach den von Barschall und Bauer gemachten Erfahrungen (Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte 24, S. 561) wurde erst nach 48 Stunden filtriert und der Niederschlag nach Kjeldahl verbrannt. Er lieferte unter den vorliegenden Verhältnissen ein Gemenge verschiedener Körper, das sich aber weiter trennen läfst.

Zur Bestimmung des Kreatins und des Kreatinins wurde nach Bauer und Barschall (a. a. O. S. 562) zunächst das Kreatinin kolorimetrisch durch Überführen in die Pikrinsäureverbindung bestimmt, sodann durch 4stündiges Erhitzen auf dem Wasserbade in $\frac{1}{3}$ normal salzsaurer Lösung auch das Kreatin in Kreatinin übergeführt und der Zuwachs an Kreatinin als Kreatin in Rechnung gesetzt.

Bei der Bestimmung des Aminostickstoffs wurde gleichfalls nach den Angaben der erwähnten Autoren verfahren. Dabei werden eventuell vorhandene alkylierte Basen teilweise mitgefällt, die Aminosäuren jedoch nicht absolut quantitativ zur Ausfällung gebracht. Es wurde eine entsprechende Korrektur angebracht (0,00002 g N pro Kubikzentimeter der Lösung).

Die flüchtigen Basen wurden durch Destillation mittelst Natriumkarbonat im Vakuum nach einer von Grafe[1]) ausgearbeiteten Methode bestimmt. Je 20 g der Lösung wurden in ein Gemisch von 100 ccm einer gesättigten $Na_2 \cdot CO_3$-Lösung, 100 ccm einer gesättigten Na Cl-Lösung und 70 ccm Alkohol gegossen und die im Vakuum unter 40° übergehenden flüchtigen Basen in titrierter Säure aufgefangen.

Aus diesen einzelnen Bestimmungen läfst sich folgendes ableiten:

a) Der Albumosen-N.

b) Der Pepton-N (+ Hexonbasen-N), hierzu mufs von dem Phosphorwolframsäure N abgezogen werden: der Albumosen-N + N der flüchtigen Ammoniakverbindungen + dem N des Kreatinins; die Hexonbasen wurden wegen ihrer geringen Menge vernachlässigt.

c) Der flüchtige Basen-N; = dem direkten Befund + dem verdunsteten Anteil an Basen (N-Defizit).

d) Zieht man von dem N-Gehalt der Flüssigkeit, wie er zu Beginn des Versuchs oder auch zu Ende desselben gefunden wurde, den N des Phosphorwolframsäure-Niederschlags + Aminostickstoff ab, so bleibt ein meist kleiner N-Rest, der zweifellos auf solche Anteile der Fleischextraktivstoffe, welche nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, zurückgeführt werden mufs. Rubner hat schon im Jahre 1879 (Zeitschr. f. Biol. XV, S. 488) gezeigt, dafs nur ein kleiner Teil des Extrakt-N (= 15,6%) von Phosphorwolframsäure gefällt wird. Da die Extraktiv-

1) Zeitschrift für physiologische Chemie 1906, Bd. XLVIII, S. 300.

stoffe nur in kleinen Mengen vorhanden waren, fällt der auf diese Körper treffende N-Anteil auch nur gering aus.

e) Kreatin und Kreatinin wurden für sich in Rechnung gestellt.

f) Desgleichen der Amino-N.

Daraus ergibt sich, dafs wir demnach über eine ganze Zahl von Stoffgruppen durch die Analyse Auskunft geben können, teils handelt es sich um Körper, deren Nährfähigkeit aufser Zweifel steht (Albumosen, Peptone), teils um sichere Produkte des Abbaues (flüchtige Basen, Amino-N).

## Versuche.

### Vibrio Finkler-Prior.

Über die Ernährungseigentümlichkeiten dieses Keimes ist so gut wie nichts bekannt; man weifs, dafs man selten einmal die Indolreaktion und dann meist sehr schwach erhält, Schwefelwasserstoff findet man in kleinen Mengen in 9—10 Tagen alten Kulturen. Bekannt ist noch sein starkes Leimlösungsvermögen.

Die Versuche mit diesem Keime hatten folgendes Ergebnis:

Stickstoff-Stoffwechsel des Vibrio Finkler prior in g N.

| | 4. I. 07 | 14. I. 07 | 24. I. 07 | 4. II. 07 |
|---|---|---|---|---|
| Bakteriensubstanz . . . | 0,0000 | 0,1124 | 0,1866 | 0,1317 |
| Lösung . . . . . . . | 0,7926 | 0,6802 | 0,6060 | 0,6609 |
| Gesamtstickstoff . . . | 0,7926 | 0,7926 | 0,7926 | 0,7626 |
| Albumosen . . . . . . | 0,3152 | 0,2240 | 0,2204 | 0,1848 |
| Phosphorwolframsäure . | 0,7090 | 0,5894 | 0,5178 | 0,5642 |
| Flüchtige Basen . . . | 0,0272 | 0,0316 | 0,0336 | 0,0434 |
| Kreatin . . . . . . . | 0,0150 | 0,0278 | 0,0270 | 0,0389 |
| Kreatinin . . . . . . . | 0,0466 | 0,0500 | 0,0490 | 0,0490 |
| Aminostickstoff . . . . | 0,0342 | 0,0488 | 0,0534 | 0,0454 |

Das Wachstum war ein sehr gutes wie die Ernten erkennen lassen.

Daraus folgt: In der ersten Periode des Hauptwachstums sind angegriffen worden: Albumosen und Pepton und etwas von dem Rest-N. Es haben sich vermehrt: Kreatinin, Aminosäuren und flüchtige Basen, doch ist die Mehrung sehr unbedeutend.

Finkler-Prior: in 200 g sind enthalten:

| | Vor dem Versuch g | Nach 10 Tagen g | Nach 20 Tagen g | Nach 30 Tagen g |
|---|---|---|---|---|
| Gesamt-N . . . | 0,7926 | | | |
| Album. . . . | 0,3152 | 0,2240 | 0,2204 | 0,1848 |
| Pepton . . . | 0,3200 | 0,2838 | 0,2148 | 0,2870 |
| Kreat.+Kreatin. | 0,0616 | 0,0778 | 0,0760 | 0,0879 |
| Amino-N . . . | 0,0342 | 0,0488 | 0,0534 | 0,0454 |
| Rest-N . . . . | 0,0344 | 0,0142 | 0,0078 | 0,0124 |
| Flücht. Basen . | 0,0272 | 0,0316 | 0,0336 | 0,0434 |
| Ernte . . . . | 0 | 0,1124 | 0,1866 | 0,1317 |

In dieser Periode ist so gut wie alles zum Aufbau der Leibessubstanz verwendet worden. Dies zeigt sich am deutlichsten, wenn man die absoluten Differenzen einander gegenüberhält, wie sie sich aus Tabelle S. 45 errechnen lassen, und wie sie auch später in Tabelle S. 58 zusammengestellt sind. Man hat:

| Summe der Abnahme: | | Zunahme: | |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0912 | Kreatin . . | 0,0162 |
| Pepton . . | 0,0362 | Aminos. . . | 0,0146 |
| Rest-N . . . | 0,0202 | flücht. Basen | 0,0042 |
| | 0,1476 | | 0,0350 |
| Bakterien . . | 0,1124 | | |
| | 0,0352 | | |

Aufser den zum Ansatz nötigen Stoffe ist also die sonstige Veränderung des Nährbodens verschwindend klein. Es müssen daher wohl N-freie Stoffe für den Stoffwechsel verwendet worden sein.

In der zweiten Periode (10—20 Tage) zeigen sich folgende Änderungen:

| Summe der Abnahme: | | Zunahme: | |
|---|---|---|---|
| Album. . . | 0,0036 | Aminos. . . | 0,0046 |
| Pepton . . . | 0,0690 | flücht. Basen | 0,0018 |
| Rest-N . . . | 0,0064 | | 0,0064 |
| Kreatin . . | 0,0018 | | |
| | 0,0808 | | |
| Bakterien . . | 0,0742 | | |
| | 0,0066 | | |

Fast alles umgesetzte N findet sich demnach in den Bakterien wieder. Damit steht fest, dafs eben die N-haltigen Stoffe, wie Albumosen und Pepton, nahezu ausschliefslich im Aufbau verwertet worden sind und sonstige Prozesse des Abbaues verschwindend kleine Werte darstellen. Von den Albumosen (0,3152) ist ein Teil (0,0948), nämlich 30,7% aufgebraucht von Pepton (0,3200) etwas mehr (0,1052) = 32,9%.

In der dritten Periode (20.—30. Tag) nimmt die Bakteriensubstanz ab, es findet offenbar ein Absterben der Bakterien unter gleichzeitiger Auflösung statt.

| Summe der Abnahme: | | | Zunahme: |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0356 | Pepton . . . . . | 0,0722 |
| Aminostickstoff | 0,0080 | Kreatin + Kreatinin | 0,0119 |
| | 0,0436 | Rest-N . . . . . | 0,0046 |
| Abnahme d. Bakt. | 0,0549 | flüchtige Basen . . | 0,0098 |
| | 0,0987 | | 0,0985. |

Bei der Auflösung der Bakterien werden vermutlich tryptische Fermente frei, welche auch die Abnahme der Albumosen bedingen. Die Bildung des Peptons, Kreatins und der flüchtigen Basen ist auf Zerfall der Leibessubstanz der Bakterien zurückzuführen.

Neben dem Ansatz im Wachstum wird man, in Analogie zu den Umsetzungen, die Rubner für die Hefe geschildert hat, annehmen dürfen, dafs immer kleine Mengen N-haltiger Substanz gespalten werden, selbst da, wo nur N-freie Stoffe den eigentlichen Umsatz bestreiten. Es würde also dann das Auftreten kleinster Mengen von Spaltprodukten wohl verständlich sein. Finkler-Prior bestreitet also nur die für das Wachstum nötigen Stoffe aus dem N-haltigen Material — seine sonstigen energetischen Bedürfnisse müssen daher in anderer Weise geregelt sein.

Da trotz lebhaften Wachstums kein $SH_2$ auftritt oder nur in Spuren, gehört hier wenigstens die $SH_2$-Bildung nicht zu den beim Organaufbau nötigen Umsetzungen. Dies ist auch schon

von Rubner für den Wurzelbazillus durch die Untersuchung des S-Stoffwechsels erwiesen worden.

Der Wurzelbazillus entnimmt einer Nährlösung nur so viel S, als sich am Ende des Versuchs in den neugebildeten Bakterien findet.

Nicht uninteressant ist, dafs Cramer (Arch. f. Hyg. XXII, S. 167) für den dem Vibrio Finkler nahestehenden Vibrio Cholerae sehr ähnliche Verhältnisse gefunden hat. Dieser Keim vermag den Stickstoff der alkalischen Bouillon vorzüglich auszunutzen, die Ernte nach 3 Tagen beträgt 13,9—20,1% des ursprünglich vorhandenen Stickstoffs. Ammoniak wird dabei nur in geringer Menge gebildet. Cramer hält bei dem Vibrio Cholerae eine direkte Gasatmung für erwiesen: »Der direkte Kontakt mit dem atmosphärischen Sauerstoff (in einem Häutchen bildenden Stamm) befähigt die Cholerabazillen, den Nährboden besser auszunutzen, als wenn selbst bei reichlichster Luftzufuhr kein solcher Kontakt stattfindet.« Bei Häutchen bildenden Stämmen war die Ernte etwa doppelt so grofs als bei anderen Stämmen desselben Keimes.

### B. Faecalis alcaligenes.

Bei faec. alcaligenes wurde der Versuch nach 30 Tagen beendet, doch war nach 20 Tagen kaum mehr eine Erntezunahme zu erzielen, denn die kleinen gefundenen Differenzen fallen in die Fehlergrenzen eines gleichen Wachstums.

Stickstoff-Stoffwechsel des Bac. faecal. alcalig. in g N.

| | 19. X. 06 | 29. X. 06 | 7. XI. 06 | 17. XI. 06 |
|---|---|---|---|---|
| Bakteriensubstanz . . . | 0,0000 | 0,0204 | 0,0296 | 0,0234 |
| Lösung . . . . . . . . | 0,5074 | 0,4852 | 0,5006 | 0,4776 |
| Gesamtstickstoff . . . | 0,5074 | 0,5056 | 0,5302 | 0,5110 |
| Albumosen . . . . . . | 0,1094 | 0,1090 | 0,0972 | 0,0940 |
| Phosphorwolframsäure . | 0,4358 | 0,0000 | 0,3938 | 0,3974 |
| Flüchtige Basen . . . | 0,0300 | 0,0422 | 0,0696 | 0,0784 |
| Kreatin . . . . . . . | 0,0258 | 0,0130 | 0,0126 | 0,0226 |
| Kreatinin . . . . . . . | 0,0506 | 0,0540 | 0,0562 | 0,0408 |
| Aminostickstoff . . . . | 0,0252 | 0,0358 | 0,0376 | 0,0290 |

Faec. alcalig.

| | Vor dem Versuch g | Nach 10 Tagen g | Nach 20 Tagen g | Nach 30 Tagen g |
|---|---|---|---|---|
| Gesamt-N . . . | 0,5074 | | | |
| Album. . . . | 0,1094 | 0,1090 | 0,0972 | 0,0940 |
| Pepton . . . . | 0,2458 | — | 0,1708 | 0,1842 |
| Kreat + Kreatin. | 0,0764 | 0,0670 | 0,0688 | 0,0634 |
| Amino-N . . . | 0,0252 | 0,0358 | 0,0376 | 0,0290 |
| Rest-N . . . . | 0,0206 | — | 0,0338 | 0,0350 |
| Flücht. Basen . | 0,030 | 0,0422 | 0,0696 | 0,0784 |
| Ernte . . . . | 0 | 0,0204 | 0,0296 | 0,0298 |

In der ersten Periode ging die Bestimmung des Rest-N verloren.

Die Ergebnisse zeigen ein anderes Bild als bei Finkler-Prior. Auffallend ist sofort das Unberührtbleiben der Albumosen, reichlich dient aber Pepton und die Kreatingruppe zur Nahrung. Aminosäuren und flüchtige Basen treten in gleicher Menge als Abfallstoffe auf.

Die absoluten Werte der Umsetzungen waren:

| als | Abnahme | als | Zunahme |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0004 | Aminosäure . | 0,0106 |
| Pepton . . | 0,0375 | flücht. Basen | 0,0122 |
| Kreatin . . | 0,0094 | | 0,0228 |
| | 0,0473 | | |
| Bakterien . . | 0,0204 | | |
| | 0,0269 | | |

In der zweiten Periode des Wachstums des faec. alcaligenes ist nicht zu verkennen, dafs der Abbau von Stoffen zum mindesten noch erheblich sich erhält.

Mit Ausschlufs des Rest-N, der unsicher ist, ergibt sich:

| als | Abnahme | als | Zunahme |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0118 | Aminosäure . | 0,0018 |
| Pepton . . . | 0,0375 | flücht. Basen . | 0,0396 |
| Kreatin . . | 0,0018 | | 0,0414 |
| | 0,0511 | | |
| Bakterien . . | 0,0092 | | |
| | 0,0419 | | |

Auf das Wachstum kommt hier kaum 1/4 der Umsetzungen des N, Aminosäuren und Basen treten in beachtenswerter Menge auf und müssen aus Pepton vor allem erzeugt worden sein.

In der dritten Periode sind die Veränderungen des Nährbodens minimale, für den Anwuchs ist sozusagen nichts mehr verbraucht worden. Es machen sich aber trotzdem kleine Umsetzungen geltend. Im Gegensatze zur Abnahme kleiner Albumosenmengen sehen wir einen analogen Zuwachs an Pepton — wohl rein fermentativer Natur — und der Abnahme von Kreatin, Aminosäure, Rest-N steht eine Zunahme von flüchtigen Basen gegenüber.

Von den Albumosen sind in 30 Tagen rund 14,12% verschwunden, vom Pepton aber 25,1%, letzteres ist also fast doppelt so stark als Nährstoff in Anspruch genommen worden.

Die Erzeugung flüchtiger Basen ist weit bedeutender als bei Finkler-Prior gewesen, ohne dafs man aber den Eindruck sehr gewaltiger Umwälzungen erhält.

Finkler-Prior ist sicher ein Keim, der entweder neben der N-Ernährung, die er zum Wachstum notwendig hat, überhaupt nur N-freie Stoffe im Leben benutzt, oder durch oxydativen Abbau der N-haltigen Nahrung mit wenig Nährmaterial auskommt. Bei faecalis alcaligenes findet man eine Art Mittelstellung, die $NH_3$-Bildung ist reichlicher geworden, ein Verwüsten N-haltiger Nährsubstanzen ist es aber entschieden nicht.

Beide Keime zeigen durch ihre Vorliebe für Sauerstoff an sich schon an, dafs letzterer offenbar in der Zersetzungsgleichung eine Rolle spielt.

Bei der Alkoholhefe, der Milchsäurebildung, der Essigsäurebildung, kennt man Fermente, welche diese Umwandlungen hervorrufen können, es ist daher auch zu erwarten, dafs für die Umlagerung der N-haltigen Stoffe, für welche beim Tiere so stark wirkende Fermente in Pepsin und den tryptischen Substanzen vorhanden sind, analog auch bei den Bakterien Körper sich finden, welche nach Abtötung des Mikroorganismus noch

fortwirken. Berghaus hat auch in der Tat bei Proteus vulgaris für die Ammoniakbildung einen solchen fermentativen Prozefs nachgewiesen.

Aus ähnlichen Überlegungen wurde daher bei faecalis alcaligenes eine zweite Versuchsreihe angestellt und nach 10 Tagen Toluol zugegeben und gründlich gemischt.

Der Erfolg des Experimentes ist aus der nachstehend angeführten Tabelle zu ersehen:

II. Versuch. Faec. alcalig.

| | Vor dem Versuch g | Nach 10 Tagen g | Nach 20 Tagen mit Toluol g |
|---|---|---|---|
| Gesamt-N . . . | 0,3963 | | |
| Album. . . . | 0,1576 | 0,1481 | 0,0814 |
| Pepton . . . . | 0,1525 | 0,1025 | 0,1363 |
| Kreatin . . . | 0,0308 | 0,0321 | 0,0290 |
| Amino-N . . . | 0,0171 | 0,0186 | 0,0209 |
| Rest-N . . . . | 0,0247 | 0,0293 | 0,0575 |
| Flücht. Basen . | 0,0136 | 0,0460 | 0,0493 |
| Ernte . . . . | 0 | 0,0197 | 0,0218 |

Es wurde zum Vergleich die Periode 10.—20. Tag des ersteren Versuchs mit faecalis alcaligenes herangezogen. Der Charakter der Zerlegung bei toluolisierten Bakterien und lebenden Bakterien ist sehr verschieden. Auch nach Abtötung der letzteren finden noch Zersetzungen statt. Sie charakterisieren sich in erster Linie durch ein starkes Angreifen der Albumosen, während der lebende faecalis alc. nur wenig von ihnen verwendet. Die Albumosen werden offenbar hauptsächlich in Pepton übergeführt. Dies steht in Übereinstimmung mit einem ähnlichen Vorgang bei den nicht künstlich abgetöteten Kulturen zwischen dem 20.—30. Tag der vorigen Reihe. Neben der Peptonbildung erfolgt aber noch vor allem die Bildung von Rest-N, dagegen schreitet die Zerlegung nicht weiter bis zur Bildung von gröfseren Mengen flüchtiger Basen, wie dies in der lebenden Kultur geschieht. Im ganzen ist der Zerlegungsverlust ähnlich den Wirkungen eines tryptischen Fermentes.

In absoluten Zahlen ist die Veränderung folgende gewesen:

| Abnahme | | Zunahme | |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0677 | Pepton . . . | 0,0338 |
| Kreatin . . | 0,0031 | Amino-N . . | 0,0024 |
| | 0,0708 | Rest-N . . . | 0,0282 |
| | | flücht. Basen . | 0,0033 |
| | | | 0,0677 |

Die auffallende Bevorzugung des Peptons als Nährstoff bei den lebenden Keimen scheint im Gegensatz zu stehen zu dem Vorhandensein des tryptischen Fermentes, es ist dieser Widerspruch aber leicht zu lösen. Das Ferment ist offenbar endozellular und für die Umwandlungen innerhalb der Zelle nötig, nach der Toluolisierung lösen sich wahrscheinlich die Zellen zum Teil auf, und nunmehr können die Fermente frei in der Nährflüssigkeit sich verteilen. Ähnlich steht es mit der Endotryptase bei der Hefezelle. Die der Toluolisierung folgende Autolyse der Zellen kann also hinsichtlich der fermentativen Wirkungen der lebenden und intakten Zelle zu Täuschungen Veranlassung geben.

### Bac. mesentericus.

Bac. mesent. stellt sich in seinem Verbrauch an N-haltigen Nährstoffen ähnlich dem V. Finkler-Prior, insofern Albumosen stark angegriffen werden.

Stickstoff-Stoffwechsel des Bac. Mesent. vulgatus in g N.

| | 4. I. 07 | 14. I. 07 | 24. I. 07 | 4. II. 07 |
|---|---|---|---|---|
| Bakteriensubstanz . . . | 0,0000 | 0,0572 | 0,1008 | 0,0404 |
| Lösung . . . . . . . | 0,7926 | 0,7366 | 0,6700 | 0,6718 |
| Gesamtstickstoff . . . | 0,7926 | 0,7938 | 0,7708 | 0,7122 |
| Albumosen . . . . . | 0,3152 | 0,0476 | 0,0272 | 0,0379 |
| Phosphorwolframsäure . | 0,7090 | 0,5486 | 0,5124 | 0,4997 |
| Flüchtige Basen . . . | 0,0272 | 0,1480 | 0,2136 | 0,2102 |
| Kreatin . . . . . . | 0,0150 | 0,0280 | 0,0265 | 0,0276 |
| Kreatinin . . . . . . | 0,0466 | 0,0570 | 0,0531 | 0,0551 |
| Aminostickstoff . . . . | 0,0342 | 0,0990 | 0,0550 | 0,0688 |

Bac. mesenteric.

| | Vor dem Versuch g | Nach 10 Tagen g | Nach 20 Tagen g | Nach 30 Tagen g |
|---|---|---|---|---|
| Gesamt-N . . . | 0,7926 | — | — | — |
| Album. . . . . | 0,3152 | 0,0476 | 0,0272 | 0,0379 |
| Pepton . . . . | 0,3200 | 0,2960 | 0,2185 | 0,1965 |
| Kreat.+Kreatin. | 0,0616 | 0,0850 | 0,0796 | 0,0827 |
| Amino-N . . . | 0,0342 | 0,0990 | 0,0550 | 0,0688 |
| Rest-N . . . . | 0,0344 | 0,0598 | 0,0761 | 0,0757 |
| Flücht. Basen . | 0,0272 | 0,1480 | 0,2354 | 0,2906 |
| Ernte . . . . | 0 | 0,0572 | 0,1008 | 0,0404 |

Pepton steht in der Benutzung sehr weit zurück, die N-haltigen Abbauprodukte sind stark vertreten.

Es beträgt in absoluter Zahl in der ersten Periode:

| | die Abnahme | | die Zunahme |
|---|---|---|---|
| an Albumosen | 0,2676 | Kreatin . . | 0,0234 |
| Pepton . . . | 0,0240 | Aminos. . . | 0,0648 |
| | 0,2916 | Rest-N . . . | 0,0254 |
| ab für Bakt. | 0,0572 | Basen . . . | 0,1208 |
| | 0,2344 | | 0,2342 |

Was hier also zum Wachstum benötigt wurde, ist sehr klein im Verhältnis zu den sonstigen Veränderungen im N-haltigen Material.

Bac. mesent. ist unzweifelhaft ein Keim, dessen Stoffwechsel sich zum erheblichen Teil durch Albumosen und Peptone bestreiten läfst.

In der zweiten Periode (10.—20. Tag) kann man folgende Werte berechnen:

| | die Abnahme | | die Zunahme |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0204 | Rest-N . . . | 0,0163 |
| Peptone . . | 0,0775 | flücht. Basen | 0,0874 |
| Kreatin . . | 0,0054 | | 0,1037 |
| Aminosäure . | 0,0440 | | |
| | 0,1473 | | |
| ab. für Bakt. . | 0,0436 | | |
| | 0,1037 | | |

Auch hier überwiegt der Dissimulationsprozefs an N-haltigem Material erheblich den Ansatz. Von den Albumosen sind 91,3% verbraucht, von Pepton nur 38,6%.

In der dritten Periode treten, ähnlich wie bei Vibrio Finkler Absterbevorgänge in Erscheinung.

| | Abnahme | | Zunahme |
|---|---|---|---|
| Pepton . . . . | 0,0220 | Albumosen . . . | 0,0107 |
| Rest-N . . . . . | 0,0004 | Kreatin + Kreatinin | 0,0031 |
| | 0,0224 | Aminostickstoff . . | 0,0138 |
| Abnahme d. Bakt. . | 0,0604 | Flücht. Basen . . | 0,0552 |
| | 0,0820 | | 0,0828. |

Die Abnahme der Bakteriensubstanz ist bei Bac. mesentericus anders zu deuten als bei Vibrio Finkler. Während dieser seine Lebensfähigkeit wirklich einbüfst, tritt bei ersterem sicher, wenigstens zum Teil, Sporulation ein. Damit im Zusammenhang steht sicher der Unterschied in den auftretenden Produkten: bei Vibrio Finkler Pepton, bei Bac. mesentericus Albumosen und reichlich flüchtige Basen. Es spricht dies dafür, dafs bei der Sporenbildung dissimilatorische Vorgänge eine wichtige Rolle spielen. Möglicherweise werden dabei nach vollendeter Sporulation die Reste des Bakterienleibes aufgelöst und dabei manche Stoffe, die für die Sporensubstanz entbehrlich waren, ausgeschieden.

## Proteus vulgaris.

Von Prot. vulgaris ist bekannt, dafs er bei allerlei Fäulnisprozessen mit beteiligt ist. Durch die Untersuchungen Rubners weifs man, wie sehr Proteus auch auf reinen Fleischextraktlösungen wächst. Bei dem Wachstum wird so viel N aus dem Nährboden entnommen, dafs zweifellos die Albumosen doch nicht ausreichen, um die Nutrition zu bestreiten. Es werden auch die Extraktstoffe im engeren Sinne mit verwertet. Er bildet reichlich $SH_2$, verwendet dabei organischen Schwefel; Ammoniak wird reichlich gebildet.

Unsere Ergebnisse sind in folgender Tabelle niedergelegt:

Stickstoff-Stoffwechsel des Bac. Proteus vulgaris in g N.

| | 6. XI. 06 | 16. XI. 06 | 26. XI. 06 | 6. XII. 06 |
|---|---|---|---|---|
| Bakteriensubstanz . . . | 0,0000 | 0,0230 | 0,0358 | 0,0378 |
| Lösung . . . . . . . . | 0,7926 | 0,7622 | 0,7484 | 0,7086 |
| Gesamtstickstoff . . . | 0,7926 | 0,7852 | 0,7842 | 0,7464 |
| Albumosen . . . . . . | 0,3152 | 0,0552 | 0,0470 | 0,0446 |
| Phosphorwolframsäure . | 0,7090 | 0,6050 | 0,5112 | 0,5404 |
| Flüchtige Basen . . . | 0,0272 | 0,1690 | 0,2560 | 0,3116 |
| Kreatin . . . . . . . . | 0,0150 | 0,0073 | 0,0132 | 0,0078 |
| Kreatinin . . . . . . . | 0,0466 | 0,0385 | 0,0294 | 0,0200 |
| Aminostickstoff . . . . | 0,0342 | 0,0282 | 0,0470 | 0,0672 |

Proteus vulgaris.

| | Vor dem Versuch g | Nach 10 Tagen g | Nach 20 Tagen g | Nach 30 Tagen g |
|---|---|---|---|---|
| Gesamt-N . . | 0,7926 | | | |
| Albnm. . . . . | 0,3152 | 0,0552 | 0,0440 | 0,0440 |
| Pepton . . . . | 0,3200 | 0,3423 | 0,1818 | 0,1648 |
| Kreat.+Kraetin. | 0,0616 | 0,0458 | 0,0426 | 0,0278 |
| Amino-N . . . | 0,0342 | 0,0282 | 0,0470 | 0,0672 |
| Rest-N . . . . | 0,0344 | 0,1217 | 0,1770 | 0,0932 |
| Flücht. Basen . | 0,0272 | 0,1768 [1] | 0,2644 | 0,3578 |
| Ernte . . . . | 0 | 0,0230 | 0,0358 | 0,0378 |

Proteus vulgaris nimmt in erster Linie die Albumosen aus der Nährlösung weg, greift Kreatin an, scheint auch zuerst Aminoverbindungen zu lösen, flüchtige Basen entstehen in grofser Menge. Besonders bemerkenswert erscheint die Tatsache, dafs eine Vermehrung des Peptons auftritt und des Rest-N; dies läfst keine andere Erklärung zu, als dafs Albumosen nicht nur zum Wachstum benutzt werden, sondern sofort eine weitere Spaltung erfuhren. Für die erste Periode enthält man folgende Bilanz:

1) Der Verlust an Gesamt-N-Verdunstung von $NH_3$ ist hinzugezählt.

| | Abnahme | | Zunahme |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,2600 | Pepton . . . | 0,0223 |
| Kreatin . . | 0,0158 | Rest-N . . . | 0,0373 |
| Ammoniak . | 0,0060 | flücht. Basen | 0,1496 |
| | 0,2818 | | 0,2592 |
| ab für Bakt. | 0,0230 | | |
| | 0,2588 | | |

In der zweiten Periode bleiben die Albumosen, die wohl soweit als möglich aufgezehrt sind, ziemlich unberührt, aber die Peptonspaltung tritt an ihre Stelle; auch die Kreatingruppe liefert noch etwas N.

Die Bilanz lautet:

| | Abnahme | | Zunahme |
|---|---|---|---|
| Albumosen . | 0,0112 | Aminosäure . | 0,0188 |
| Pepton . . . | 0,1605 | Rest-N . . . | 0,0553 |
| Kreatin . . | 0,0032 | flücht. Basen . | 0,0876 |
| | 0,1749 | | 0,1617 |
| Bakter. . . . | 0,0158 | | |
| | 0,1591 | | |

In der dritten Periode ist tatsächlich die Albumose als N-Quelle versiegt, der Rest-N und Pepton rücken an die Stelle der ersteren.

Wir haben:

| | Abnahme | | Zunahme |
|---|---|---|---|
| Pepton . . . | 0,0170 | Amino-N . . | 0,0202 |
| Kreatin .. . | 0,0148 | flücht. Basen . | 0,0934 |
| Rest-N . . . | 0,0838 | | 0,1136 |
| | 0,1156 | | |
| Bakter. . . . | 0,0020 | | |
| | 0,1126 | | |

Die Ausnutzung der Albumosen (0,3152) beträgt (0,2712) 87,5%, die des Peptons (0,3050) war (0,1552) 48,5%, von der Kreatingruppe (0,0616) sind (0,0338) 54,8% umgesetzt worden.

## Schlufsfolgerungen.

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Möglichkeit, den Bakterienstoffwechsel systematisch aufzuklären, ergeben. Sie lassen wenigstens in grofsen Zügen die Besonderheiten der verschiedenen Keime wohl erkennen; sie geben ein Bild von den Fällen, in welchen N-haltige Stoffe nur im Wachstum oder auch anderweitig benutzt werden. Damit leisten sie der Systematik der Ernährungsphysiologie der Mikroben wesentliche Dienste.

Die im einzelnen eben geschilderten Umsetzungen sind von sehr verschiedener Bedeutung für die Charakterisierung der Keime. Die 4 Spezies haben, was den Aufbau anlangt, sehr ungleich die Nahrungsstoffe in Anspruch genommen.

Vibrio Finkler nahm Albumosen, Peptone und den Rest-N (Extraktivstoffe) auf, am meisten von beiden ersten.

Faecalis alcaligenes benutzt wenig Albumosen, sehr viel Pepton und kann auch Kreatin verwerten.

Bac. mesentericus Albumosen in erster Linie, dann Pepton, und kleine Anteile von Kreatin und Aminosäure in der späteren Periode.

Proteus viel Albumosen, weniger Pepton, und eine geringere Menge der Kreatingruppe.

Was nun zum Aufbau benutzt wurde, kann man nicht mit Bestimmtheit sagen, wenn man aber berücksichtigt, dafs gerade in der Wachstumsperiode eine sehr starke Anziehung auf taugliche Nährstoffe ausgeübt wird, so wird es doch wahrscheinlich, dafs die stark ausgebeuteten Albumosen in 3 von den 4 Fällen auch zuerst für das Wachstum herangezogen worden sein können. Haben sie aber allein ausgereicht, das Wachstum zu decken?

Wir hatten:

| | Finkler | Faekalis | Mesent. | Proteus |
|---|---|---|---|---|
| Albumosen verwertet | 0,0948 | 0,0154 | 0,2880 | 0,2712 |
| Endernte . . . . . | 0,1866 | 0,0298 | 0,1008 | 0,0378 |
| | — 0,0918 | — 0,0144 | + 0,1772 | + 0,2334 |

In zwei Fällen reichten — Finkler und Faecalis — die Albumosen nicht hin, das Wachstum zu erklären, hier müssen also Peptone mit verwendet worden sein; bei Mesent. und Proteus ist weit mehr Albumose, als zum Wachstum nötig war, gespalten worden.

Dafs die Albumosen direkt aufgenommen und angesetzt wurden, ist damit nicht gesagt. Bei Proteus ist es durch das Versuchsergebnis nicht unwahrscheinlich, dafs die Albumosen noch ehe sie aufgenommen werden, in Peptone übergeführt werden.

An das Wachstum schliefst sich die weitere Frage an, in welch ungleichem Mafse bei den 4 Keimarten der Verbrauch von N-haltigen Stoffen sich gestaltete. Eine Nebeneinanderstellung hat nur Zweck, wenn wir die ungleichen Ernten dabei berücksichtigen und berechnen, wie viel z. B. auf 1 mg mittlerer Ernte an Nahrungsstickstoff verbraucht wurde.[1]) Man findet dann folgendes:

Auf 1 mg mittlerer Ernte mg Nahrungsstickstoff verbraucht:

| | Finkler | Faecalis | Mesent. | Proteus |
|---|---|---|---|---|
| I. Periode | 0,62 | 1,99 | 8,64 | 21,98 |
| II. » | 0,53 | 1,41 | 1,29 | 5,61 |
| III. » | — | 0 | — | 3,06 |

Bei Finkler-Prior wird in einer Periode von 10 Tagen nur 0,5—0,6 N auf 1 mg mittlere Ernte, oder täglich 5—6% der Leibesmasse an N verbraucht, das ist, mit dem Mafse des enormen energetischen Umsatzes dieser Organismen gemessen, eine sehr geringe Gröfse, die etwa dem täglichen N-Verlust einer in Zuckerlösung gärenden Hefe entspricht.[2])

Faecalis alcaligenes hat einen etwas gröfseren N-Verbrauch, der vielleicht noch in den Rahmen ähnlicher Prozesse wie sie eben für Finkler-Prior berührt wurden, hinein gehört.

1) Der als Ernte erscheinende N ist schon aufser Rechnung gebracht.

2) Nach Versuchen von Prof. Rubner, welche noch nicht veröffentlicht sind.

N-freie Stoffe müssen auch hier die Versorgung mit Energie bestreiten, doch kann möglicherweise ein Teil der N-haltigen Stoffe eine oxydative Spaltung erfahren haben.

Untersuchungen, welche im hiesigen Laboratorium früher ausgeführt worden sind, haben ergeben, dafs bei Vibrionen, welche an der Oberfläche in der Form von Häuten wachsen, wie V. Finkler, mehr flüchtige Säuren sich bilden, als wenn sie untergetaucht sind.

Einer ganz anderen Kategorie von Keimen gehören Bac. mesenter. und Proteus vulgaris an.

Bei Bac. mesent. treten wir zuerst mit einem Mikroben in Beziehung, der bereits mit starker Zerlegungskraft ausgestattet zu sein scheint; grofs ist allerdings der Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Periode. Sieht man sich die Originalzahlen S. 53 näher an, so liegt hier eine eigenartige Umwandlung von Albumosen zugrunde, die in der ersten Periode nur bis zur Bildung von Aminosäure, Rest-N, Kreatinin fortschritt. Die flüchtigen Basen, die zweifellosen Endprodukte, machen nur die Hälfte aller Umwandlungsprodukte aus. Das erinnert etwas an die Mitwirkung eines Albumose spaltenden Fermentes. Die Produkte werden dann in der zweiten Periode erst vollkommen aufgespalten.

Berücksichtigt man dies, so würden die Unterschiede zwischen der ersten und zweiten Periode sich viel kleiner gestalten müssen. Zweifellos kommt aber der N Spaltung als Energiequelle für die Ernährung der Zelle hier eine viel gröfsere Bedeutung zu als bei den beiden anderen Keimen. Wir wissen nun leider nicht, welcher Art die Umsetzungen des kohlestoffhaltigen Anteils der N-haltigen Nährstoffe gewesen sind. Dafs sie rein oxydativ gewesen seien, ist ganz unwahrscheinlich, aber selbst wenn man diese Annahme machen wollte, ist der Bac. mesentericus doch keine Mikrobe, die das energetische Bedürfnis aus dem Zerfall von Albumosen und Peptonen decken kann.

Somit käme man zu der Anschauung, dafs hier eine Triplizität der Ernährungsprozesse vorliegt.

a) Verbrauch N-haltiger organischer Stoffe zum Wachstum.
b) Verbrauch derselben Stoffe, um einen Teil des energetischen Bedürfnisses zu decken.
c) Verbrauch unbekannter N-freier Körper oder oxydative Auflösung eines Teils der N-haltigen Körper.

Bei Proteus liegt die umfangreichste Verwertung N-haltigen Materials vor, doch mufs auch hier dasselbe Argument wie bei Bac. mesent. Geltung erhalten: die erste Periode liefert reichlich Spaltprodukte der Albumosen, die späterhin erst mehr und mehr in die flüchtigen Basen übergehen. Auch hierbei wird ein tryptisches Ferment erst die Spaltung der Albumosen einleiten, Pepton- und Rest-N, selbst wertvolle Nahrungsstoffe, treten zuerst im Überschusse auf, um dann stufenweise zu zerfallen.

Die drei Perioden sind natürlich auch wegen allmählicher Benachteiligung der Bakterien durch die Anhäufung von $NH_3$ ungleich im N-Verbrauch durch Proteus. Will man einer optimalen Leistung des Proteus durch Rechnung näherkommen, so kann man die erste Periode wählen.

Die Mittelernte war 11,5 mg N, und erzeugt wurden 0,1496 g flüchtige Basen; erachtet man nur letztere als Produkte endgültiger Auflösung der Albumosen und Peptone, so hat 1 mg Mittelernte 13,01 mg N in 10 Tagen umgesetzt = 1,30 im Tag. Die energetische Leistung von Proteus beträgt nach Rubner pro 1 g N und 24 Stunden 19,4 kg-Kal. bei Ernährung in Fleischextraktlösung. Läfst man die Diskussion über die Frage, ob die Nährlösung eine spezifische Wirkung auf die Wärmebildung besitzt, ganz zur Seite, so stünden also 19,4 kg-Kal. Umsatz — 1,3 g N als Resultat der Umwandlung und endgültigen Auflösung N-haltiger Körper gegenüber. Dabei ist aufser Rechnung geblieben jener N-Anteil, welcher auf einer früheren Stufe der Zersetzung in dieser Periode Halt gemacht hat.

Man müfste also annehmen, dafs durch die Spaltung der N-haltigen Stoffe für 1,3 g N 19,4 kg-Kal. frei geworden sind, bzw. weniger, weil ja die nicht zu $NH_3$ abgebauten Stoffe gar nicht gerechnet worden sind. Natürlich soll auch nur eine rohe

Schätzung versucht werden, denn eine solche bietet immerhin auf dem noch unsicheren und neuen Boden solcher Fragen eine gewisse Kontrolle.

Wie viel Wärme bei solchen Spaltungen frei werden kann, ist unbekannt, aber sicher ist, dafs diese Zerlegungen erhebliche Wärmequellen sind. Dafür werden in einer späteren Arbeit Beweise gebracht werden.

Man kann aber in anderer Richtung die Frage begrenzen. Man weifs, wie viel im Tierkörper bei oxydativer Spaltung von Eiweifsstoffen frei wird, und diese Zahl darf natürlich von unserer Schätzung nicht erreicht werden. Auf 1 g N treffen nach Rubner rund 26 kg-Kal. an Wärme, die Zahl müfste noch erhöht werden wenn nur $NH_3$ abgespalten würde, wie dies die Bakterien machen (gegen 30 kg-Kal.). Die für die anaerobe Spaltung geschätzten Wärmewerte 1,3 N = 19,4 kg-Kal; 1 N = 15 bleiben also etwa um die Hälfte hinter den bei oxydativer Spaltung gewonnenen Gröfsen zurück.

Die Differenz mufs aber noch erheblicher sein, weil die Umwandlung in Pepton und Rest-N = 0,1096 g N im ganzen aufser Anschlag bleiben mufste; sie voll dem Abbau der Verbindungen in $NH_3$ gleichzusetzen, geht aber ebensowenig an.

Es ist also sehr gut möglich, ja sicher, dafs Proteus durch die Spaltung seines Nährmaterials sich die nötigen Energiequellen erschliefst.

All dies zusammen genommen, darf man wohl behaupten, dafs Proteus vulgaris unter den untersuchten Keimen der einzige ist, welcher mit grofser Wahrscheinlichkeit »ein Fleischfresser« und echter Fäulniskeim, ein monotropher Mikrobe, ist.

# Aviditätsstudien an Hämolysinen und Agglutininen.

Von

Dr. **Paul Th. Müller,**

Privatdozent und Assistent am Institute.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Graz.)

## Einleitung.

Aviditätsverhältnisse spielen bekanntlich in der Immunitätslehre eine ganz hervorragende Rolle. Insbesondere sind es hier Ehrlich und seine Schüler gewesen, welche Besonderheiten und Differenzen der Aviditätsverhältnisse sowohl bei Antigenen wie bei Antikörpern in ausgiebigem Mafse zur Erklärung der verschiedenartigsten Phänomene herangezogen haben und mit Hilfe dieses Erklärungsprinzips in der Tat eine ganze Reihe sonst schwer verständlicher Beobachtungen begreiflich machen konnten. Diese Tatsache ist wohl so bekannt, dafs wir auf eine detaillierte Wiedergabe aller jener Probleme der Immunitätslehre, bei welchen die Affinität eine wichtige Rolle spielt, füglich verzichten können, und dafs wir uns mit der einfachen Aufzählung derselben begnügen dürfen. So sei nur an die Ehrlichsche Toxinanalyse erinnert, welche diesem Forscher zur Aufstellung von Partialtoxinen verschiedener Affinität, von Proto-Deutero-Tritotoxinen etc. geführt haben; an die Phänomene der Komplementablenkung, der Komplementoidwirkungen, überhaupt der Hemmungswirkungen thermisch oder chemisch veränderter Antigene und Antikörper, an die Probleme der Toxinunempfindlichkeit

und -überempfindlichkeit usw., um die grofse Wichtigkeit der Affinitätsverhältnisse für die verschiedensten Gebiete der Immunitätsforschung ins richtige Licht zu setzen.

Aber auch jene Forscher, welche, wie Arrhenius, Madsen u. a., sich den Anschauungen Ehrlichs nicht anschliefsen konnten, haben doch der Affinität der Antikörper zu ihren Antigenen alle Beachtung geschenkt und mancherlei interessante Tatsachen diesbezüglich zutage gefördert.

In ähnlicher Richtung bewegen sich nun auch die Untersuchungen der vorliegenden Studie. Dieselbe beschäftigt sich nämlich mit den Aviditätsverhältnissen der Antikörper unserer Immunsera, speziell der Hämolysine und Agglutinine, die nach verschiedenen Gesichtspunkten experimentell bearbeitet wurden. Zunächst schien es mir, mit Rücksicht auf die Ehrlichschen Anschauungen von der Pluralität der Antikörper, die in jedem Immunserum enthalten sind, von Interesse, festzustellen, ob diese Pluralität auch in den Verschiedenheiten ihrer Affinitäten zum Ausdruck kommt, oder ob die Partialantikörper, die bei der Immunisierung entstehen, sämtlich ungefähr gleiche Aviditätswerte aufweisen. Ich möchte dabei gleich von vornherein vorausschicken, dafs ich mit dem Ausdruck Avidität oder Affinität nichts über die Natur des Vorganges präjudizieren möchte, der sich zwischen Antigene und Antikörper abspielt, sondern dafs damit nur das mehr minder intensive Bestreben dieser Substanzen bezeichnet werden soll, aufeinander einzuwirken, einerlei ob es sich dabei um chemische Bindung, um Lösungsvorgänge, um Ab- oder Adsorptionsprozesse handeln mag. Dabei soll als Mafs dieser Vereinigungstendenz beider Komponenten einerseits die Schnelligkeit, mit welcher dieselbe erfolgt, also die sogenannte Reaktionsgeschwindigkeit, anderseits die Vollständigkeit der Bindung oder Absorption betrachtet werden.

Die Frage, ob in einem gegebenen Immunserum Antikörper von verschiedener Avidität gleichzeitig nebeneinander vorhanden sind, schien mir nun auf folgendem Wege lösbar zu sein.

Nehmen wir an, wir hätten es etwa mit einem hämolytischen Serum zu tun und bringen wir dasselbe mit den entsprechenden Erythrozyten zusammen, so wird ein Teil der in demselben enthaltenen spezifischen Ambozeptoren an die roten Blutkörperchen gebunden werden, und, wenn man die letzteren durch die Zentrifugalkraft aus dem Serum wieder entfernt, wird somit das Serum an Wirksamkeit eingebüfst haben und eine geringere Menge von Antikörpern enthalten als vorher. Sind nun tatsächlich Ambozeptoren verschiedener Avidität in dem hämolytischen Immunserum vorhanden, so ist klar, dafs die Absorption durch die Erythrozyten sich ganz besonders auf die avidesten Ambozeptoren erstrecken mufs, derart, dafs von diesen letzteren mehr an die Blutkörperchen gebunden wird, als von den weniger aviden Zwischenkörpern. Die Folge davon wird aber notwendigerweise die sein müssen, dafs in dem absorbierten Serum sich das quantitative Verhältnis zwischen den aviden und den weniger aviden Ambozeptoren zugunsten der letzteren verschoben haben wird, dafs mit andern Worten die durchschnittliche Avidität der in dem Serum zurückgebliebenen Antikörper eine geringere sein wird als vor der Absorption. Bestimmt man nun den Absorptionsquotienten, d. i. das Verhältnis der von einer gegebenen Blutmenge absorbierten Menge von Ambozeptoren zu der Gesamtmenge der Ambozeptoren, die den Blutkörperchen zur Absorption dargeboten wurden, und zwar einmal für das unveränderte, das andere Mal für das absorbierte Serum, so mufs sich folgendes Verhalten herausstellen: da die Affinität der in dem absorbierten Serum zurückbleibenden Ambozeptoren zu den Erythrozyten, wie ausgeführt, eine geringere sein mufs, so wird auch die Menge des absorbierten Antikörpers hier eine geringere sein müssen, der Absorptionsquotient wird also — vorausgesetzt, dafs hier nur die Avidität eine Rolle spielt — kleiner ausfallen als bei dem unveränderten, zum Ausgange der Experimente dienenden Immunserum.

Je öfter die Absorption des Immunserums wiederholt wird, desto mehr wird der besagte Quotient abnehmen müssen, bis nur mehr Ambozeptoren schwächster Avidität in dem Serum vorhanden sind.

Allerdings wird sich diese Abnahme des Absorptionsquotienten nicht unmittelbar in ihrem vollen Werte dokumentieren können und zwar deshalb, weil noch ein anderer Faktor hier in Betracht kommt, der in gerade entgegengesetzter Richtung auf diesen Quotienten einwirken mufs. Wie nämlich Eisenberg und Volk zuerst gezeigt haben, ist der Absorptionsquotient sehr wesentlich abhängig von der absoluten Menge der Antikörper, die mit den betreffenden Antigenen in Berührung gebracht werden, derart, dafs die Absorption um so vollständiger ist, der Absorptionsquotient also um so gröfseren Wert annimmt, je geringere Ambozeptorenmengen zum Versuche verwendet wurden. Da nun aber mit wiederholter Absorption natürlich der Ambozeptorengehalt des Serums immer kleiner wird, so wird also hierdurch einerseits eine Steigerung des Wertes des Absorptionsquotienten bewirkt, während anderseits die erwähnte Abnahme der Avidität dahin tendiert, eine Verminderung desselben zu erzeugen; die tatsächlich zustande kommende Änderung des Quotienten wird somit ihrer Richtung nach davon abhängig sein, ob die erstere oder die letztere der beiden erwähnten Tendenzen das Übergewicht über die andere davonträgt.

Welcher dieser beiden Fälle nun de facto realisiert ist, darüber kann natürlich nur das Experiment Aufschlufs geben.

Soviel wird man jedoch — die Richtigkeit des obigen Raisonnements vorausgesetzt — erwarten dürfen: dafs nämlich der Verlauf der Absorptionskoeffizienten ein ganz verschiedener sein wird, je nachdem die Verminderung der ins Spiel kommenden Mengen von Immunkörpern durch wiederholte Absorption oder einfach durch Verdünnung des Immunserums bewerkstelligt wird.

Damit war aber die Richtung für die folgenden Experimente gegeben. Die Fragestellung lautete daher folgendermafsen:

Wie verhalten sich die Absorptionsquotienten

a) bei wiederholter Absorption,

b) bei entsprechender Verdünnung des Immunserums,

und sind dieselben unter diesen Bedingungen für gleiche Quantitäten in Aktion tretender Immunkörper gleich oder verschieden?

Zu meinen Versuchen dienten einerseits eine Reihe hämolytischer Sera, welche durch Behandlung von Kaninchen mit gewaschenem Rinderblut gewonnen waren, anderseits Typhusimmunsera vom Pferd und vom Kaninchen. Das vom Pferde stammende Typhusserum (»Edgar«) erhielt ich vor einigen Jahren von Herrn Prof. Kraus in Wien, die Kaninchensera wurden hier im Institut durch Einspritzung von karbolisierten Typhuskulturen hergestellt.

## I. Hämolysinversuche.

Ich gehe nun zuerst zur Besprechung meiner Versuche mit hämolytischen Seren über und möchte bezüglich der eingehaltenen Technik nur folgendes bemerken. Die Ambozeptorsera wurden im inaktivierten Zustand, in der Regel mit $^1/_2$ proz. Karbolsäure versetzt aufgehoben. Die Bestimmung ihres Wirkungswertes geschah in der üblichen Weise, unter Verwendung von 0,5 cm, 5,0 m oder — und zwar letzteres am häufigsten — von 1,0 cm 5 proz. Rinderblutaufschwemmung und der eben hinreichenden Menge von Meerschweinchenkomplement. Gewöhnlich wurden von letzterem 0,03—0,05 cm gebraucht, um zusammen mit geringen Mengen des Ambozeptorserums diese Blutaufschwemmung vollkommen aufzulösen.

Zur Absorption wurde gewaschener Blutkörperchenbrei verwendet und zwar in solcher Menge, dafs auf jeden Kubikzentimeter Serum die Blutkörperchen von 1 cm 5 proz. Aufschwemmung kamen. Nach meist 2 stündigem Kontakt bei Zimmertemperatur wurde von den Erythrozyten abzentrifugiert und die

klare Flüssigkeit nunmehr neuerdings der Absorption unterworfen, wobei jedoch ein Teil derselben für die Titerbestimmung reserviert wurde. Nachdem so die wiederholten Absorptionen vollzogen waren, wurde dann gleichzeitig der Titer sowohl für das Ausgangsserum wie für die einzelnen, bei den verschiedenen Phasen des Versuchs sich ergebenden Flüssigkeiten ermittelt. Parallel mit diesen Versuchen wurden aufserdem noch verschiedene Verdünnungen des Ausgangsserums einer einmaligen Absorption unterworfen, und auch hier mit den sich ergebenden Zentrifugaten die Bestimmung des Wirkungswertes ausgeführt, um eben die so erhaltenen Absorptionsquotienten mit jenen vergleichen zu können, die sich bei wiederholter Absorption des Stammserums ergeben.

Bemerkt sei noch, dafs als »Bluteinheit« die Menge von 0,5 cm 5proz. Aufschwemmung, als »Ambozeptoreinheit« die zur Lösung dieser Blutmenge erforderliche Serumquantität bezeichnet wurde.

Ich lasse nun zunächst eine Reihe von Vorversuchen mit ihren Protokollen folgen, bei welchen die beiden erwähnten Versuchsreihen nicht gleichzeitig miteinander angestellt wurden und daher, streng genommen, nicht vollkommen miteinander vergleichbar sind. Gleichwohl lassen auch diese Versuche bereits das charakteristische Verhalten, das die Absorptionsquotienten bei dem eigentlichen Parallelversuche aufweisen, so deutlich erkennen, dafs deren Wiedergabe nicht überflüssig erscheinen dürfte, und dafs dieselben zur Unterstützung der letzteren dienen können.

## a) Vorversuche.

**Wiederholte Absorption desselben Ambozeptorserums.**

I. Versuch. 30. XII. 06.

6 ccm 5proz. Rinderblutaufschwemmung + 6 ccm Antirinderblut (Ambozeptorserum) (ohne Karbolzusatz); nach 4stünd. Kontakt bei Zimmertemperatur abzentrifugiert (Zentrifugat I). Zur Komplettierung dient 0,05 ccm Meerschweinchenserum; zum hämolytischen Versuch stets 0,5 ccm Blutaufschwemmung verwendet. 6 ccm Zentrifugat I wird dann wieder mit 6 ccm Rinderblut gemischt und neuerdings nach 4stünd. Kontakt durch die Zentrifuge von den Erythrozyten getrennt (Zentrifugat II).

| Menge ambozeptorhaltiger Flüssigkeit | Original-Ambozeptor-serum | Zentrifugat I | Zentrifugat II |
|---|---|---|---|
| 0,1 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | vollk. Lösung |
| 0,08 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | vollk. Lösung |
| 0,05 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | vollk. Lösung |
| 0,03 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | f. vollk. Lösung |
| 0,01 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | starke Lösung |
| 0,008 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | starke Lösung |
| 0,005 | vollk. Lösung | s. starke Lösung | geringe Lösung |
| 0,003 | vollk. Lösung | mäfsige Lösung | 0 |
| 0,001 | vollk. Lösung | 0 | 0 |
| 0,0008 | vollk. Lösung | 0 | 0 |
| 0,0005 | starke Lösung | 0 | 0 |
| 0,0003 | geringe Lösung | 0 | 0 |
| 0,0001 | 0 | 0 | 0 |

Berechnung des Resultats:

1 ccm Originalserum $= \frac{1}{0{,}0008}$ Amboz.-Einh. = 1250 A.-E.

$\left[= \frac{1}{0{,}00075}\right.$ A.-E. = 1333 A.-E.$\left.\right]$[1]

1 ccm Zentrifugat I $= \frac{1}{0{,}008}$ A.-E. = 125 A.-E.

$\left[= \frac{1}{0{,}0065}\right.$ A.-E. = 153 A.-E.$\left.\right]$

2 ccm Z. I (entspr. 1 ccm Originalserum) = 250 [306] A.-E.

1 ccm Zentrifugat II $= \frac{1}{0{,}03} =$ 33,3 A.-E.

2 ccm Z. II (entspr. 1 ccm Z. I) = 66,6 A.-E.

Somit: in 1 ccm Originalserum enthalt. vor Absorption 1250 A.-E. [1333]
nach » 250 » [306]

absorbiert 1000 A.-E. [1027]
Absorptionskoeff. **0,8 [0,8]**

in 1 ccm Zentrifugat I enthalt. vor Absorption 125,0 A.-E. [153]
nach » 66,6 »

absorbiert 58,4 A.-E. [86,4]
Absorptionskoeff. **0,46 [0,56]**.

1) Bei den eingeklammerten Berechnungen ist angenommen, dafs die wahre lösende Dosis zwischen der letzten, im Experiment gefundenen, lösenden Dosis und der ersten, nicht mehr vollkommene Hämolyse bewirkenden liegen mufs. Dieselbe wäre also z. B. für Zentrifugat I zwischen 0,008 und 0,005, also etwa bei 0,0065 gelegen.

II. Versuch. 8. I. 07.

Anordnung wie bei Versuch I, nur mit dem Unterschied, dafs Zentrifugat I (10 ccm) mit dem Bodensatz von 5 ccm Blutaufschwemmung in Berührung gebracht wird, und das hierbei resultierende Zentrifugat II neuerdings mit den abzentrifugierten Blutkörperchen von 5 ccm Aufschwemmung absorbiert wird, so dafs also Z. II und III gegen Z. I keine Verdünnung erfahren haben, dagegen ist Z. I durch Mischung von 5 ccm Originalambozeptorserum mit 5 ccm Blutaufschwemmung gewonnen, das Serum hierbei auf das Doppelte verdünnt worden.

Als Komplement dient 0,02 ccm Meerschweinchenserum.

| Menge | Ambozeptorserum | Zentrifugat I | Zentrifugat II | Zentrifugat III |
|---|---|---|---|---|
| 0,02 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. |
| 0,015 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. |
| 0,010 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. |
| 0,008 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. |
| 0,006 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. |
| 0,004 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. |
| 0,003 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | f. vollk. Lös. | starke Lösung |
| 0,0025 | vollk. Lös. | f. vollk. Lös. | mäfsige Lös. | mäfsige Lös. |
| 0,0020 | vollk. Lös. | mäfsige Lös. | geringe Lös. | 0 |
| 0,0015 | vollk. Lös. | geringe Lös. | 0 | 0 |
| 0,0010 | vollk. Lös. | 0 | 0 | 0 |
| 0,0008 | starke Lösung | 0 | 0 | 0 |
| 0,0006 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Resultat:**

1. 1 ccm Originalserum:

vor Absorption $\frac{1}{0,001}\left[\frac{1}{0,0009}\right] = 1000\ (1111)$ A.-E.

nach » $\frac{1}{0,003}\left[\frac{1}{0,00275}\right] = 333\ (400)$ A.-E.

(2 ccm Z. I entspr. 1 ccm Original.)

Absorptionskoeff.: $\frac{1000-333 \cdot 2}{1000} = \mathbf{0{,}33} \left[\frac{1111-400 \cdot 2}{1111} = 0{,}28\right]$.

2. 1 ccm Zentrifugat I:

vor Absorption $\frac{1}{0,003}\left[\frac{1}{0,00275}\right] = 333\ (400)$ A.-E.

nach » $\frac{1}{0,004}\left[\frac{1}{0,0035}\right] = 250\ (285)$ A.-E.

(1 ccm Z. II entspr. 1 ccm Z. I.)

Absorptionskoeff.: $\frac{333-250}{333} = \mathbf{0{,}25} \left[\frac{400-285}{400} = 0{,}29\right]$.

3. 1 ccm Zentrifugat II:

$$\text{vor Absorption} \quad \frac{1}{0,004}\left[\frac{1}{0,0035}\right] = 250\ (285)\ \text{A.-E.}$$

$$\text{nach} \quad \text{»} \quad \frac{1}{0,004} = 250\ \text{A.-E.}$$

(1 ccm Z. III entspricht 1 ccm Z. II.)

$$\text{Absorptionskoeffizient:}\ \frac{285-250}{285} = 0,12.$$

## III. Versuch.

Anordnung genau wie in Versuch II, Titration jedoch nicht mit 0,5 sondern mit 5 ccm Blutaufschwemmung.

| Menge | Originalserum | Zentrifug. I | Zentrifug. II | Zentrifug. III |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 | vollk. Lösung | vollk. Lösung | vollk. Lösung | vollk. Lösung |
| 0,09 | | | | |
| 0,08 | | | | |
| 0,07 | | | | |
| 0,06 | | | | f. vollk. Lös. |
| 0,05 | | | f. vollk. Lös. | s starke Lös. |
| 0,04 | | f. vollk. Lös. | starke Lös. | starke Lös. |
| 0,03 | | starke Lös. | » » | » » |
| 0,025 | | » » | » » | mäfsige Lös. |
| 0,0225 | | » » | » » | » » |
| 0,0200 | | » » | mäfsige Lös. | geringe Lös. |
| 0,0175 | f. vollk. Lös. | » » | » » | » » |
| 0,0150 | sehr starke L. | mäfsige Lös. | » » | Spur |
| 0,0125 | » » » | Spur | Spur | » |
| 0,010 | » » » | » | » | 0 |
| 0,009 | starke Lös. | » | 0 | 0 |
| 0,008 | mäfsige Lös. | 0 | 0 | 0 |
| 0,007 | geringe Lös. | 0 | 0 | 0 |
| 0,006 | Spur | 0 | 0 | 0 |

Berechnung des Resultats:

1. 1 ccm Originalserum vor Absorption $\frac{1}{0,002} = 500$ A.-E.

$$\text{nach} \quad \text{»} \quad \frac{1}{0,005} = 200\ \text{A.-E.}$$

2 ccm Z. I entspricht 1 ccm Originalserum.

$$\text{Absorptionskoeffizient}\ \frac{500-2\cdot 200}{500} = 0,2.$$

2. 1 ccm Zentrifugat I vor Absorption $\frac{1}{0{,}005} = 200$ A.-E.

nach » $\frac{1}{0{,}006} = 166$ A.-E.

1 ccm Z. II entspricht 1 ccm Z. I.

Absorptionskoeffizient $\frac{200-166}{200} = \mathbf{0{,}17}$.

3. 1 ccm Zentrifugat II vor Absorption $\frac{1}{0{,}006} = 166$ A.-E.

nach » $\frac{1}{0{,}007} = 143$ A.-E.

1 ccm Z. III entspricht 1 ccm Z. II.

Absorptionskoeffizient $\frac{166-143}{166} = \mathbf{0{,}13}$.

IV. Versuch. 23. I. 07.

20 ccm Ambozeptorserum I werden mit dem Bodensatz von 10 ccm 5proz. Blutaufschwemmung absorbiert, nach 2stünd. Stehen abzentrifugiert. 15 ccm des erhaltenen Zentrifugats I werden neuerdings mit dem Bodensatz von 7,5 ccm Blutaufschwemmung absorbiert, und endlich 10 ccm des sich ergebenden Zentrifugats II mit den Erythrozyten von 5 ccm Aufschwemmung zusammengebracht. Nach Abzentrifugieren resultiert Zentrifugat III. Zur Titration wird je 1 ccm Blutaufschwemmung benutzt.

| Menge | Originalserum | Zentrifug. I | Zentrifug. II | Zentrifug. III |
|---|---|---|---|---|
| 0,020 | | | | |
| 0,0175 | | | | |
| 0,0150 | | | | |
| 0,0125 | | | | vollk. Lös. |
| 0,0100 | | | vollk. Lös. | |
| 0,0090 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | | |
| 0,0080 | | | | |
| 0,0070 | | | | |
| 0,0060 | | | | f. vollk. Lös. |
| 0,0050 | | | f. vollk. Lös. | s. starke Lös. |
| 0,0040 | | f. vollk. Lös. | starke Lös. | starke Lös. |
| 0,0030 | s. starke Lös. | s. starke Lös. | mäfsige Lös. | mäfsige Lös. |
| 0,0025 | starke Lös. | starke Lös. | » » | geringe Lös. |

Berechnung:

1. 1 ccm Originalserum vor Absorption $\frac{2}{0{,}004} = 500$ A.-E.

nach » $\frac{2}{0{,}005} = 400$ »

Absorptionskoeffizient $\frac{500-400}{500} = \mathbf{0{,}2}$.

2. 1 ccm Zentrifugat I vor Absorption $\frac{2}{0{,}005} = 400$ A.-E.

nach » $\frac{2}{0{,}006} = 333$ »

Absorptionskoeffizient $\frac{400-333}{400} = \mathbf{0{,}17}$.

3. 1 ccm Zentrifugat II vor Absorption $\frac{2}{0{,}006} = 333$ A.-E.

nach » $\frac{2}{0{,}007} = 286$ »

Absorptionskoeffizient $\frac{333-286}{333} = \mathbf{0{,}14}$.

**Einmalige Absorption verschiedener Verdünnungen desselben Ambozeptorserums.**

V. Versuch.

Je 5 ccm Rinderblutaufschwemmung werden mit 5 ccm Serum versetzt und zwar in folgenden Verdünnungsgraden: 1, 2, 4, 8, 16; nach 2 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur wird abzentrifugiert und die Flüssigkeiten auf ihren Ambozeptorgehalt titriert (jedesmalige Blutmenge 0,5 ccm).

| Menge | Zentrif. I konz. $^1/_2$ | Zentrif. II konz. $^1/_4$ | Zentrif. III konz. $^1/_8$ | Zentrif. IV konz. $^1/_{16}$ | Zentrif. V konz. $^1/_{32}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,8 | | | | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,6 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,4 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,3 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,25 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,20 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,15 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,10 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,08 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,06 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. |
| 0,04 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | f. vollk. L. |
| 0,03 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | starke Lös. |
| 0,025 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | starke Lös. | geringe Lös |
| 0,020 | vollk. L. | vollk. L. | vollk. L. | mäfsige Lös. | Spur |
| 0,015 | vollk. L. | vollk. L. | starke Lös. | geringe Lös. | 0 |
| 0,010 | vollk. L. | vollk. L. | mäfsige Lös. | Spur | 0 |
| 0,008 | vollk. L. | vollk. L. | geringe Lös. | | 0 |
| 0,006 | vollk. L. | vollk. L. | Spur | 0 | 0 |
| 0,004 | vollk. L. | vollk. L. | 0 | 0 | 0 |
| 0,003 | vollk. L. | starke Lös. | 0 | 0 | 0 |
| 0,0025 | | mäfsige Lös. | 0 | 0 | 0 |
| 0,0020 | starke Lös. | geringe Lös. | 0 | 0 | 0 |
| 0,0015 | geringe Lös. | Spur | 0 | 0 | 0 |
| 0,0010 | Spur | 0 | 0 | 0 | 0 |

1 ccm Voll-Ambozeptorserum = 1075 A.-E.

Berechnung:

1. 1 ccm Ambozeptorserum $^1/_2$ = 538 A.-E.

   nach Absorption $\frac{1}{0,0025}$ = 400 »

   **Absorptionskoeffizient** $\frac{538-400}{538}$ = **0,25.**

2. 1 ccm Ambozeptorserum $^1/_4$ = 269 A.-E.

   nach Absorption $\frac{1}{0,004}$ = 200 »

   **Absorptionskoeffizient** $\frac{269-200}{269}$ = **0,25.**

3. 1 ccm Ambozeptorserum $^1/_8$ = 134,5 A.-E.

   nach Absorption $\frac{1}{0,02}$ = 50 A.-E.

   **Absorptionskoeffizient** $\frac{134,5-50}{134,5}$ = **0,62.**

4. 1 ccm Ambozeptorserum $^1/_{16}$ = 67,2 A.-E.

   nach Absorption $\frac{1}{0,03}$ = 33,3 »

   **Absorptionskoeffizient** $\frac{67,2-33,3}{67,2}$ = **0,5.**

5. 1 ccm Ambozeptorserum $^1/_{32}$ = 33,6 A.-E.

   nach Absorption $\frac{1}{0,06}$ = 16,6 »

   **Absorptionskoeffizient** $\frac{33,6-16,6}{33,6}$ = **0,5.**

### VI. Versuch. 10. I. 07.

Anordnung wie Versuch V; Titration jedoch mit 5 ccm statt mit 0,5 ccm Blutaufschwemmung.

Konzentrationen des Ambozeptorserums: $^1/_2$, $^1/_{16}$ und $^1/_{64}$.

| Menge | Original-ambozeptor-serum | Zentrif. I konz. $^1/_2$ | Zentrif. II konz. $^1/_{16}$ | Zentrif. III konz. $^1/_{64}$ |
|---|---|---|---|---|
| 2,5 | | | | |
| 2,4 | | | | vollk. Lös. |
| 2,3 | | | | |
| 2,2 | | | | |
| 2,1 | | | | fast vollk. Lös. |
| 2,0 | | | | » » » |
| 1,8 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | vollk. Lös. | starke Lösung |
| 1,6 | | | | » » |
| 1,4 | | | | » » |
| 1,2 | | | | mäfsige Lös. |
| 1,0 | | | | » » |
| 0,9 | | | | geringe Lös. |
| 0,8 | | | | » » |

| Menge | Original-ambozeptor-serum | Zentrif. I konz. $^1/_2$ | Zentrif. II konz. $^1/_{16}$ | Zentrif. III konz. $^1/_{64}$ |
|---|---|---|---|---|
| 0,7 | | | fast vollk. Lös. | Spur |
| 0,6 | | | » » » | |
| 0,5 | | | starke Lösung | |
| 0,4 | | | mäfsige Lös. | |
| 0,3 | vollk. Lös. | vollk. Lös. | » » | |
| 0,25 | | | geringe Lös. | |
| 0,225 | | | » » | |
| 0,200 | | | » » | |
| : | | | | |
| 0,10 | | | | |
| 0,09 | | | | |
| 0,08 | | vollk. Lös. | | |
| 0,07 | | | | 0 |
| 0,06 | | | | |
| 0,05 | vollk. Lös. | | | |
| 0,04 | | fast vollk. Lös. | | |
| 0,03 | | starke Lösung | 0 | |
| 0,025 | | » » | | |
| 0,0225 | | » » | | |
| 0,0200 | | » » | | |
| 0,0175 | fast vollk. Lös. | mäfsige Lös. | | |
| 0,0150 | » » » | » » | | |
| 0,0125 | s. starke Lös. | » » | | |
| 0,0100 | starke Lösung | geringe Lös. | | |
| 0,009 | » » | » » | | |

Berechnung:

1. 1 ccm Originalserum voll $= \frac{1}{0,002} = 500$ A.-E.

1 » Zentrifugat I $= \frac{1}{0,005} = 200$ »

2 ccm Z. I entspricht 1 ccm Originalserum.

Absorptionskoeffizient $\frac{500-400}{500} = \mathbf{0,2}$.

2. 1 ccm Originalserum $^1/_{16} = \frac{500}{16} = 31,2$ A.-E.

1 » Zentrifugat II $= \frac{1}{0,08} = 12,5$ A.-E.

1 » Z. II entspricht 1 ccm Originalserum $^1/_{16}$.

Absorptionskoeffizient $\frac{31,2-12,5}{31,2} = \mathbf{0,6}$.

3. 1 ccm Originalserum $^1/_{64} = \frac{500}{64} = 7,8$ A.-E.

1 » Zentrifugat III $= \frac{1}{2,2} = 0,45$ A.-E.

1 » Z. III entspricht 1 ccm Originalserum $^1/_{64}$.

Absorptionskoeffizient $\frac{7,8-0,45}{7,8} = \mathbf{0,9}$.

## VII. Versuch.

5 fach verdünntes Originalserum:

a) 10 ccm mit dem Bodensatz von 10 ccm Blutaufschwemmung absorbiert,

b) 5 ccm Originalserum (5 fach) aufs Doppelte verdünnt, + Bodensatz von 10 ccm Blutaufschwemmung,

c) 3,33 ccm Originalserum (5 fach) auf 10 ccm verdünnt, + Bodensatz von 10 ccm Blutaufschwemmung.

Nach zweistündigem Kontakt abzentrifugiert. Titration mit je 1 ccm Blutaufschwemmung.

| Menge | Originalserum 1 : 5 | Zentrif. a (1 : 5) | Zentrif. b (1 : 10) | Zentrif. c (1 : 15) |
|---|---|---|---|---|
| 0,200 | | | | |
| 0,175 | | | | |
| 0,150 | | | | vollk. Lös. |
| 0,125 | | | | |
| 0,100 | | | vollk. Lös. | Schleier |
| 0,090 | | | | starke Lösung |
| 0,080 | | vollk. Lös. | | » » |
| 0,070 | vollk. Lös. | | | mäſsige » |
| 0,060 | | | | » » |
| 0,050 | | | Schleier | geringe » |
| 0,040 | | | starke Lösung | » » |
| 0,030 | | | mäſsige » | Spur |
| 0,025 | | Schleier | » » | |
| 0,0225 | | starke Lösung | geringe » | |
| 0,0200 | Schleier | » » | » » | 0 |
| 0,0175 | starke Lösung | mäſsige » | | |
| 0,0150 | » » | » » | 0 | |
| 0,0125 | mäſsige » | geringe » | | |

Berechnung:

Originalserum 1 : 5; 1 ccm $= \frac{2}{0,0225} = 88,8$ A.-E.

$$\text{Zentrifugat a : 1 ccm} = \frac{2}{0{,}03} = 66{,}6 \text{ A.-E.}$$

$$\text{» b : 1 »} = \frac{2}{0{,}06} = 33{,}3 \text{ »}$$

$$\text{» c : 1 »} = \frac{2}{0{,}125} = 16{,}0 \text{ »}$$

Absorptionsquotient:

$$1.\ \frac{88{,}8-66{,}6}{88{,}8} = \mathbf{0{,}25}$$

$$2.\ \frac{44{,}4-33{,}3}{44{,}4} = \mathbf{0{,}25}$$

$$3.\ \frac{29{,}6-16}{29{,}6} = \mathbf{0{,}45}.$$

**Übersichtstabelle I.**

| Wiederholte Absorption desselben Serums | | | Absorption aus verschiedenen Serumverdünnungen | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amb.-Einh. dargeboten | | Absorpt.-Koeffizient | Amb.-Einh. dargeboten | | Absorpt.-Koeffizient |
| 625 | 1. Absorption | 0,80 | 538 | Verdünn. $^1/_2$ | 0,25 |
| 62.5 | 2. » | 0,46 | 269 | » $^1/_4$ | 0,25 |
| | | | 134,5 | » $^1/_8$ | 0,62 |
| 500 | 1. » | 0,33 | 67,2 | » $^1/_{16}$ | 0,50 |
| 333 | 2. » | 0,25 | | | |
| 250 | 3 » | 0.12 | 250 | » $^1/_2$ | 0,20 |
| | | | 15,6 | » $^1/_{16}$ | 0,60 |
| 250 | 1. » | 0,20 | 3,9 | » $^1/_{64}$ | 0,90 |
| 200 | 2. » | 0,17 | | | |
| 166 | 3. » | 0,13 | 44,4 | » $^1/_5$ | 0,25 |
| | | | 22,2 | » $^1/_{10}$ | 0,25 |
| 500 | 1. » | 0,20 | 14,8 | » $^1/_{15}$ | 0,45 |
| 400 | 2. » | 0,17 | | | |
| 333 | 3. » | 0,14 | | | |

Aus obiger Übersichtstabelle, welche die Resultate der Vorversuche in leichter überblickbarer Weise zusammenfafst, geht nun deutlich hervor, dafs die Absorptionsquotienten einen ganz verschiedenen Verlauf nehmen, je nachdem die Verminderung der zur Absorption dargebotenen Ambozeptormengen durch Verdünnung oder durch mehrfach wiederholte Absorption bewirkt wird. Während im ersteren Falle mit steigendem Grade der Verdünnung, also mit fallender Ambozeptormenge, ein mehr oder minder rascher Anstieg der Quotienten zu beobachten ist,

zeigen dieselben bei wiederholter Absorption eine deutliche Tendenz zur Abnahme.

Ganz analog ist das Verhalten der Absorptionsquotienten bei dem nachstehenden Parallelversuch: Auch hier ein rapides Absinken bei wiederholter Absorption, dem zwar bei dem Verdünnungsversuche kein Anstieg der Quotienten entspricht, wohl aber ein Gleichbleiben derselben; der Wert von 0,36, der übrigens noch immer erheblich höher ist als der bei wiederholter Absorption erhaltene (0,13), dürfte wohl auf einen Versuchsfehler zurückzuführen sein, der jedoch, wie man sieht, das zu demonstrierende Phänomen keineswegs zu verdecken vermag.

Jedenfalls zeigen sich also bei den Hämolysinen in der Tat deutliche Verschiedenheiten in dem Verlauf der Absorptionsquotienten, und zwar genau in dem Sinne, wie wir in den einleitenden Bemerkungen zu dieser Arbeit vermutet hatten.

### b) Parallelversuch.

2 Kaninchen durch fünf Wochen mit Rinderblut behandelt (5 Injekt.) 5 Tage nach der letzten Injektion getötet.

Serum, 5 fach verdünnt, zu den weiteren Versuchen benutzt (= Serum A) Kein Karbolzusatz!

A) Wiederholte Absorption (stets nach 2 h Einwirkungsdauer abzentrifugiert):

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 75 ccm | Ser. A + | Blutkörp. | von | 75 ccm | 5 proz. | Aufschw. | ergibt | Z. I, |
| 60 » | Z. I + | » | » | 60 » | » | » | » | » II, |
| 45 » | » II + | » | » | 45 » | » | » | » | » III, |
| 30 » | » III + | » | » | 30 » | » | » | » | » IV. |

B) Verdünnungsversuch:

10 ccm $\frac{A}{2}$ + Blutkörp. von 10 ccm Aufschw. ergibt $Z_2$.

10 » $\frac{A}{4}$ + » » 10 » » » $Z_3$.

10 » $\frac{A}{8}$ + » » 10 » » » $Z_4$.

Zur Titration 1 ccm Blut verwendet.

| Menge | Z. I (= $C_1$) 10fach | Z. II 10fach verd. | Z. III 10fach verd. | Z. IV 10fach verd. | $Z_2$ 10fach verd. | $Z_3$ 10fach verd. | $Z_4$ | A 100fach verd. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,1 | | | | | | f. v. Lös. | | |
| 1,0 | | | | | | Schleier | | v. Lös. |
| 0,9 | | | | v. Lös. | v. Lös. | trüb | | |
| 0,8 | | v. Lös. | v. Lös. | | | st. Lös. | | |
| 0,7 | v. Lös | | | | | mäfs. L. | | trüb |
| 0,6 | | | | trüb | trüb | ger. L. | | st. Lös. |
| 0,5 | | | trüb | st. Lös. | st. Lös. | Spur | | mäfs. L. |
| 0,4 | | trüb | st. Lös. | mäfs. L | mäfs. L. | » | | ger. Lös. |
| 0,3 | | st. Lös. | » » | » » | » » | | v. Lös. | Spur |
| 0,25 | trüb | » » | mäfs. L. | Spur | Spur | | | |
| 0,225 | st. Lös. | mäfs. L. | » » | » | » | | | |
| 0,200 | » » | Spur | Spur | | | | | |
| 0,175 | mäfs. L. | | | | | 0 | | |
| 0,150 | Spur | | | 0 | 0 | | | 0 |
| 0,125 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 0,100 | 0 | | | | | | | |
| 0,090 | 0 | | | | | | trüb | |

Berechnung:

1 ccm A $= 2 \cdot \frac{100}{0,8} = 2 \cdot 125$ A.-E. Quotienten: $\frac{250-66}{250} = \mathbf{0,73}$

1 » Z. I $= 2 \cdot \frac{10}{0,3} = 2 \cdot 33$ » $\frac{66-40}{66} = \mathbf{0,39}$

1 » » II $= 2 \cdot \frac{10}{0,5} = 2 \cdot 20$ » $\frac{40-352}{40} = \mathbf{0,17}$

1 » » III $= 2 \cdot \frac{10}{0,6} = 2 \cdot 16,6$ » $\frac{33,2-28,6}{33,2} = \mathbf{0,13}$.

1 » » IV $= 2 \cdot \frac{10}{0,7} = 2 \cdot 14,3$ »

Quotienten:

1 ccm $Z_1$ = Z. I. $A = 2 \cdot 125$ $\frac{250-66}{250} = \mathbf{0,73}$

1 » $Z_2 = 2 \cdot \frac{10}{0,7} = 2 \cdot 14,3$ $\frac{A}{2} = 125$ $\frac{125-28,6}{125} = \mathbf{0,76}$

1 » $Z_3 = 2 \cdot \frac{10}{1,2} = 2 \cdot 8,3$ $\frac{A}{4} = 62$ $\frac{62-16,6}{62} = \mathbf{0,73}$

1 » $Z_4 = 2 \cdot \frac{10}{1,0} = 2 \cdot 10$ $\frac{A}{8} = 31$ $\frac{31-20}{31} = \mathbf{0,36}$.

| 1 Bluteinheit wurden Ambhz.-Einh. dargeboten | Absorptionsquotienten | |
|---|---|---|
| | bei wiederholter Absorption | bei Verdünnung |
| 125 | 0,73 | 0,73 |
| 62,5 | — | 0,76 |
| 33 | 0,39 | — |
| 31 | — | 0,73 |
| 20 | 0,17 | — |
| 16,6 | 0,13 | — |
| 15,5 | — | 0,36 ? |

## 2. Agglutininversuche.

Viel einfacher und bequemer gestalten sich natürlich die Experimente bei den Agglutininen. Um auch hier wieder über die angewandte Technik das Wichtigste mitzuteilen, so sei bemerkt, dafs zu diesen Versuchen eine dichte Aufschwemmung 24 stündiger Agarkultur des Typhusbazillus benutzt wurde, welche ein für allemal hergestellt und mit ½ proz. Karbolsäure versetzt aufgehoben wurde. Aufserdem enthielt diese Aufschwemmung 10% Milchzucker, weil dieselbe infolge dieses Zusatzes länger homogen bleibt, und die Bazillen in diesem spezifisch schwereren Medium weniger Tendenz zur Sedimentierung zeigen. Zur Herstellung der Massenkulturen dienten viereckige Flaschen von 10 cm Höhe, 6 cm Breite und 4 cm Tiefe; der Bakterienbelag von 4 solchen, mit schräg erstarrtem Agar beschickten Flaschen wurde in 200 ccm Flüssigkeit aufgeschwemmt.

Zur Auswertung des Agglutinationstiters der verschiedenen Serumverdünnungen wurden je 0,2 ccm dieser Bakterienaufschwemmung benutzt; das Gesamtvolumen jeder einzelnen Probe betrug dabei 1,2 ccm. Jene Agglutininmenge, welche zur Ausflockung der eben erwähnten Bakterienmenge (also 0,2 ccm) eben hinreichte, wurde im folgenden der Bequemlichkeit halber als Agglutinineinheit bezeichnet. Zur Absorption wurde zu den betreffenden Serumproben stets der zehnte Teil ihres Volumens von der Bakterienaufschwemmung zugesetzt.

Wie bei den Hämolysinen so wurden auch hier 2 Serien von Versuchen angestellt, deren eine den Verlauf der Absorptionsquotienten bei wiederholter Absorption eines und desselben Immunserums ergeben sollte, während die andere verschiedene Verdünnungsgrade dieses Serums einer einmaligen Absorption unterwarf. Nach meist 2stündigem Kontakt der Sera bzw. Serumverdünnungen mit den Bakterien bei Zimmertemperatur wurden die letzteren durch die Zentrifuge entfernt, und die erhaltenen klaren Flüssigkeiten in der oben geschilderten Weise auf ihren Agglutiningehalt untersucht.

Da es nicht unmöglich erschien, dafs durch die stufenweise Verdünnung des Immunserums an und für sich andere Absorptionsbedingungen geschaffen wurden, als sie bei wiederholter Absorption aus konzentriertem Serum bestehen, so wurden auch einige Kontrollversuche in der Weise aufgestellt, dafs die Verdünnungen nicht wie gewöhnlich mit physiologischer Kochsalzlösung sondern mit entsprechend konzentriertem Normalserum angelegt wurden. Hierdurch mufsten alle jene Unterschiede zwischen den beiden Reihen der Parallelversuche in Wegfall kommen, welche von dem verschiedenen Eiweifsgehalt der zu absorbierenden Flüssigkeiten, von deren Viskosität usw. abhängen konnten. Ebenso wurden bei einigen Versuchen zu den verschiedenen Serumverdünnungen, die nur einer einmaligen Absorption unterzogen wurden, entsprechende Milchzuckermengen zugefügt, da ja durch den wiederholten Zusatz der zuckerhaltigen Bakterienaufschwemmung zu den Parallelproben der Milchzuckergehalt der letzteren sich erhöhen mufste und dies gleichfalls von Einflufs auf die Absorptionsverhältnisse sein konnte.

Es mag jedoch schon hier bemerkt sein, dafs eine erhebliche Änderung in dem Verlauf der Agglutininabsorption durch die kleinen methodischen Abweichungen nicht erzielt wurde, so dafs also den eben erwähnten beiden Faktoren kein merklicher Einflufs zugeschrieben werden kann, und die Verschiedenheit der Resultate beider Versuchsserien nicht auf derartige nebensächliche und zufällige Umstände zurückgeführt werden kann.

## Parallelversuch I.

A. Wiederholte Absorption. Typhusserum Edgar (Pferd).

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 50 ccm | Typhusserum (25 f. verd.) + 5 ccm | Typhusaufschw. | ergibt | Z. I |
| 45 › | Z. I + 4,5 | Typhusaufschwemmung . . . . . . . | › | › II |
| 40 › | › II + 4,0 | › . . . . . . . . | › | › III |
| 35 › | › III + 3,5 | › . . . . . . . . | › | › IV |
| 30 › | › IV + 3,0 | › . . . . . . . . | › | › V. |

B. Verdünnungsversuch (Kochsalzlösung).

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 ccm | Typhusserum | (25 f. verdünnt) | + 1 ccm | Typhusaufschw. | ergibt | $Z_1$ |
| 10 › | › | (50 f. › ) | + 1 › | › | › | $Z_2$ |
| 10 › | › | (100 f. › ) | + 1 › | › | › | $Z_3$ |
| 10 › | › | (200 f. › ) | + 1 › | › | › | $Z_4$ |
| 10 › | › | (400 f. › ) | + 1 › | › | › | $Z_5$ |
| 10 › | › | (800 f. › ) | + 1 › | › | › | $Z_6$. |

Kontakt stets 2 Stunden, dann abzentrifugiert.

| Menge | Original-serum 25×128 f. v. | Z. I 100 f. | Z. II 10 f. | Z. III | Z. IV | Z. V |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | | | | | | |
| 0,9 | | | | | | |
| 0,8 | | vollk. Agglut. | | | vollk. Agglut. | |
| 0,7 | | | | | | |
| 0,6 | vollk. Agglut. | | | | | |
| 0,5 | | | vollk. Agglut. | | | |
| 0,4 | | | | | Spur | |
| 0,3 | | | | | | |
| 0,25 | | | | vollk. Agglut. | | |
| 0,225 | | | | | | 0 |
| 0,200 | | | | | | |
| 0,175 | | | Spur | | | |
| 0,150 | | 0 | | | 0 | |
| 0,125 | 0 | | | | | |
| 0,10 | | | | | | |
| 0,09 | | | 0 | | | |
| 0,08 | | | | | | |
| 0,07 | | | | Spur | | |
| 0,06 | | | | 0 | | |

| Menge | $Z_2$ 10fach | $Z_3$ | $Z_4$ | $Z_5$ | $Z_6$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | | | | | |
| 0,9 | | | | | |
| 0,8 | | | | | |
| 0,7 | | | | | |
| 0,6 | | | | | |
| 0,5 | | | | | |
| 0,4 | vollk. Agglut. | | | | |
| 0,3 | | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 |
| 0,25 | | | | | |
| 0,225 | | | | | |
| 0,200 | | | | | |
| 0,175 | | | | | |
| 0,150 | | | | | |
| 0,125 | ger. Aggl. | | | | |
| 0,100 | 0 | 0 | | | |

Berechnung (Grenzwert: vollk. Agglutination):

**A.** Serum 25 f. verd. 1 ccm $= \frac{128}{0,25} = 512$ A.-E.

Z. I 1 » $= \frac{100}{0,5} = 200$ »

Z. II 1 » $= \frac{10}{0,2} = 50$ »

Z. III 1 » $= \frac{1}{0,08} = 12,5$ »

Z. IV 1 » $= \frac{1}{0,5} = 2$ »

Z. V 1 » $= 0$

Quotienten:

1. $\frac{512-220}{512} = \mathbf{0,57}$
2. $\frac{200-55}{200} = \mathbf{0,72}$
3. $\frac{50-13,7}{50} = \mathbf{0,72}$
4. $\frac{12,5-2,2}{12,5} = \mathbf{0,90}$
5. $\frac{2-0}{2} = \mathbf{1,0}$.

**B.** Serum 25 f. verd. 1 ccm $= \frac{128}{0,25} = 512$ A.-E. Z. I $= Z_1$ : 1 ccm $= \frac{100}{0,5} = 200$

50 f. » 1 » = 256 A.-E. $Z_2$ : 1 » $= \frac{10}{0,15} = 66,6$

100 f. » 1 » = 128 » $Z_3$ : 1 » $= \frac{1}{0,125} = 8,0$

200 f. » 1 » = 64 » $Z_4$ : 1 » = 0

400 f. » 1 » = 32 » $Z_5$ : 1 » = 0

800 f. » 1 » = 16 » $Z_6$ : 1 » = 0

Quotienten:

1. $\frac{512-220}{512} = \mathbf{0,57}$
2. $\frac{256-73,2}{256} = \mathbf{0,71}$
3. $\frac{128-8,8}{128} = \mathbf{0,93}$
4. $\frac{64-0}{64} = \mathbf{1,0}$
5. $\frac{32-0}{32} = \mathbf{1,0}$
6. $\frac{16-0}{16} = \mathbf{1,0}$

**Übersichtstabelle I.**

| Absorptionsquotienten | | |
|---|---|---|
| Agglut.-Einh. dargeboten | bei mehrfacher Absorption | bei Verdünnung |
| 512 | 0,57 | 0,57 |
| 256 | | 0,71 |
| 200 | 0,72 | |
| 128 | | 0,93 |
| 64 | | 1,00 |
| 50 | 0,72 | |
| 32 | | 1,00 |
| 16 | | 1,00 |
| 12,5 | 0,90 | |
| 8 | | (1,00) |
| 4 | | (1,00) |
| 2 | 1,00 | (1,00) |

**Parallelversuch II.**

A. Wiederholte Absorption. (Typhusserum Edgar, Pferd).

50 ccm Typhusserum (25 f. verd.) + 5 ccm Typhus ergibt Z. I usf. wie bei Versuch I.

B. Verdünnungsversuch.

10 ccm Typhusserum (25 f. verd.) + 1 ccm Typhus ergibt $Z_1$ usw. wie bei Versuch I nur mit dem Unterschied, dafs die weiteren Verdünnungen nicht mit Kochsalzlösung sondern mit 25fach verdünntem Normalpferdeserum hergestellt werden.

Kontakt 4 Stunden, dann abzentrifugiert.

| Menge | Original-serum 25×1280 f. verdünnt | Z. I 1000 fach | Z. II 100 fach | Z. III 100 fach | Z. IV 10 fach | Z. V | Z. VI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,2 | | v. Aggl. | | vollk. | | | |
| 1,1 | | Spur | | Agglut. | vollk. | | |
| 1,0 | vollk. | | | Spur | Agglut. | | |
| 0,9 | Agglut. | | | | | vollk | |
| 0,8 | | | vollk | | | Agglut. | |
| 0,7 | | | Agglut. | | | | |
| 0,6 | | | | | | | |
| 0,5 | | | | | | | 0 |
| 0,4 | | | | | | | |
| 0,3 | | 0 | | 0 | 0 | | |
| 0,25 | | | | | | | |
| 0,225 | 0 | | | | | 0 | |
| 0,200 | | | 0 | | | | |
| 0,175 | | | | | | | |
| 0,150 | | | | | | | |
| 0,125 | | | | | | | |

Berechnung (Grenzwert: vollk. Agglutination):

**A.** Serum (25 f. verd.) 1 ccm $= \frac{1280}{0,6} = 2133$ A.-E.

| | Quotienten: |
|---|---|
| Z. I 1 » $= \frac{1000}{1,2} = 833$ » | 1. $\frac{2133-916}{2133} = 0,57$ |
| Z. II 1 » $= \frac{100}{0,3} = 333$ » | 2. $\frac{833-366}{833} = 0,56$ |
| Z. III 1 » $= \frac{100}{1,1} = 91$ » | 3. $\frac{333-100}{333} = 0,70$ |
| Z. IV 1 » $= \frac{10}{0,9} = 11$ » | 4. $\frac{91-11}{91} = 0,88$ |
| Z. V 1 » $= \frac{1}{0,6} = 1,6$ » | 5. $\frac{11-1,7}{11} = 0,84$ |
| Z. VI 1 » $=$ 0 A.-E. | 6. $\frac{1,6-0}{1,6} = 1,0.$ |

| Menge | $Z_2$ 100 fach | $Z_3$ 10 fach | $Z_4$ | $Z_5$ | $Z_6$ | $Z_7$ | $Z_8$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,9 | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,8 | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,7 | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,6 | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,5 | 0 | vollk. Agglut. | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,4 | 0 | vollk. Agglut. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,225 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,175 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,125 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**B.** Serum 25 f. verd. 1 ccm $= \frac{1280}{0,6} = 2133$ A.-E. $Z_1 = Z.\,I = \frac{1000}{1,2} = 833$

| | |
|---|---|
| 50 f. » 1 » = 1066 A.-E. | $Z_2 = \frac{100}{0,6} = 166,6$ |
| 100 f. » 1 » = 533 » | $Z_3 = \frac{10}{0,4} = 25$ |
| 200 f. » 1 » = 266 » | $Z_4 = \frac{1}{0,5} = 2$ |
| 400 f. » 1 » = 133 » | $Z_5 = 0$ |
| 800 f. » 1 » = 66 » | $Z_6 = 0$ |
| 1600 f. » 1 » = 33 » | $Z_7 = 0$ |
| 3200 f. » 1 » = 16 » | $Z_8 = 0.$ |

Quotienten:

1. $\frac{2133-916}{2133} = 0,56$ 4. $\frac{266-2}{266} = 0,99$

2. $\frac{1066-183}{1066} = 0,82$ 5. $\frac{133-0}{133} = 1,0.$

3. $\frac{533-27}{533} = 0,94$

**Übersichtstabelle II.**

| Agglut.-Einh. dargeboten | Absorptionsquotienten bei mehrfacher Absorption | bei Verdünnung |
|---|---|---|
| 2133 | 0,56 | 0,56 |
| 1066 | — | 0,82 |
| 833 | 0,56 | — |
| 533 | — | 0,94 |
| 333 | 0,70 | — |
| 266 | — | 0,99 |
| 133 | — | 1,0 |
| 91 | 0,88 | — |
| 66 | — | 1,0 |
| 33 | — | 1,0 |
| 16 | — | 1,0 |
| 11 | 0,84 | 1,0 |
| 1,6 | 1,0 | (1,0) |

**Parallelversuch III.**

Serum eines Kaninchens, das 5 Injektionen mit Karbolsäure abgetöteter Typhuskultur erhalten hatte. Versuch sofort nach der Blutentnahme.

a) Absorption wiederholt: Kein Karbolzusatz zum Serum!

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40 | ccm | Serum | + 4 | ccm Ty-Bouillon | | ergibt | Z. I |
| 35 | » | Z. I | + 3,5 | » | » | » | Z. II |
| 28 | » | Z. II | + 2,8 | » | » | » | Z. III |
| 22 | » | Z. III | + 2,2 | » | » | » | Z. IV |
| 15 | » | Z. IV | + 1,5 | » | » | » | Z. V |
| 7 | » | Z. V | + 0,7 | » | » | » | Z. VI |
| 4 | » | Z. VI | + 0,4 | » | » | » | Z. VII. |

b) Verdünnungsversuch:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | ccm | Serum | $^1/_2$ + 1 | ccm Ty-Bouillon | | $= Z_2$ |
| 10 | » | » | $^1/_4$ + 1 | » | » | $= Z_3$ |
| 10 | » | » | $^1/_8$ + 1 | » | » | $= Z_4$ |
| 10 | » | » | $^1/_{16}$ + 1 | » | » | $= Z_5$ |
| 10 | » | » | $^1/_{32}$ + 1 | » | » | $= Z_6$. |

Absorptionsversuch.

| Menge | Original-serum 100 000 fach | Z. I 10 000 fach | Z. II 10 000 fach | Z. III 10 000 fach | Z. IV 10 000 fach | Z. V 10 000 fach | Z. VI 10 000 fach | Z. VII 10 000 fach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | ++ | | | | | | | |
| 0,9 | ++ | | | | | | | |
| 0,8 | ++ | | | | | | | |
| 0,7 | ++ | | | | | | | |
| 0,6 | ++ | | | | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 0,5 | ++ | | | ++ | | | | |
| 0,4 | ++ | ++ | ++ | | | | | |
| 0,3 | 0 | | | | | | | |
| 0,25 | | | | | | | | ++ |
| 0,225 | | | | | | ++ | ++ | 0 |
| 0,200 | 0 | | | | ++ | 0 | 0 | |
| 0,175 | | | | ++ | 0 | 0 | 0 | |
| 0,150 | | | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,125 | ++ | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 0,100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Berechnung:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 ccm Orig.-Ser. | $= \frac{100\,000}{0{,}4} = 250\,000$ A.-E. | | Quotienten: | |
| 1 » Z. I | $= \frac{10\,000}{0{,}125} = 80\,000$ » | 1. | $\frac{250\,000-88\,000}{250\,000}$ | = **0,62** |
| 1 » Z. II | $= \frac{10\,000}{0{,}15} = 66\,666$ » | 2. | $\frac{80\,000-73\,332}{80\,000}$ | = **0,08** |
| 1 » Z. III | $= \frac{10\,000}{0{,}175} = 57\,142$ » | 3. | $\frac{66\,666-62\,856}{66\,666}$ | = **0,05** |
| 1 » Z. IV | $= \frac{10\,000}{0{,}2} = 50\,000$ » | 4. | $\frac{57\,142-55\,000}{57\,142}$ | = **0,03** |
| 1 » Z. V | $= \frac{10\,000}{0{,}225} = 44\,444$ » | 5. | $\frac{50\,000-48\,888}{50\,000}$ | = **0,02** |
| 1 » Z. VI | $= \frac{10\,000}{0{,}225} = 44\,444$ » | | — | |
| 1 » Z. VII | $= \frac{10\,000}{0{,}25} = 40\,000$ » | 6. | $\frac{44\,444-44\,000}{44\,444}$ | = **0,009.** |

Verdünnungsversuch.

| Menge | $Z_2$ 10000 fach | $Z_3$ 10000 fach | $Z_4$ 10000 fach | $Z_5$ | $Z_6$ 100 fach |
|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | | + + | + + | | |
| 0,9 | | + + | + | + + | |
| 0,8 | + + | + + | 0 | | |
| 0,7 | | + + | | | 0 |
| 0,6 | | + | | + + | |
| 0,5 | + + | 0 | | + | |
| 0,4 | + | | | 0 | |
| 0,3 | 0 | | | | + + |
| 0,25 | | | | | + |
| 0,225 | | | 0 | | + |
| 0,200 | | 0 | | | |
| 0,175 | 0 | | | 0 | |
| 0,150 | | | | | 0 |
| 0,125 | | | | | |
| 0,100 | | | | | |

**Berechnung:**

$Z_1 = Z\,I$

$1 \text{ ccm } Z_2 = \frac{10\,000}{0{,}5} = 20\,000$ A.-E.

$1 \text{ » } Z_3 = \frac{10\,000}{0{,}7} = 14\,286$ »

$1 \text{ » } Z_4 = \frac{10\,000}{1{,}0} = 10\,000$ »

$1 \text{ » } Z_5 = \frac{1000}{0{,}6} = 1\,666$ »

$1 \text{ » } Z_6 = \frac{100}{0{,}3} = 333$ »

Quotienten:

1. 0,62
2. $\frac{125\,000 - 22\,000}{125\,000} = 0{,}82$
3. $\frac{62\,500 - 14\,286}{62\,500} = 0{,}77$
4. $\frac{31\,250 - 1\,832}{31\,250} = 0{,}94$
5. $\frac{15\,625 - 366}{15\,625} = 0{,}97.$

**Übersichtstabelle III.**

| | Absorptionsquotienten | |
|---|---|---|
| Agglutinineinheiten dargeboten | Wiederholte Absorption | Verdünnung |
| 250 000 | 0,62 | 0,62 |
| 125 000 | — | 0,82 |
| 80 000 | 0,08 | — |
| 66 666 | 0,05 | — |
| 62 500 | — | 0,77 |
| 57 142 | 0,03 | — |
| 50 000 | 0,02 | — |
| 44 444 | 0,009 | — |
| 31 250 | — | 0,94 |
| 15 625 | — | 0,97 |

### Parallelversuch IV.

Dasselbe Serum wie in Parallelversuch III, nur 10fach verdünnt (als »Original« bez.). Anordnung wie dort.

#### Absorptionsversuch.

| Menge | Originalser. 10000 fach | Z. I 1000 fach | Z. II 1000 fach | Z. III 1000 fach | Z. IV 1000 fach | Z. V 1000 fach | Z. VI 1000 fach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | | | | | | | ++ |
| 0,9 | ++ | | | | ++ | ++ | ++ |
| 0,8 | | | ++ | ++ | | | ++ |
| 0,7 | | ++ | | | | ++ | + |
| 0,6 | ++ | | | | ++ | + | 0 |
| 0,5 | + | | ++ | ++ | + | + | |
| 0,4 | 0 | ++ | + | + | + | 0 | |
| 0,3 | | + | 0 | 0 | 0 | | |
| 0,25 | | 0 | | | | | |
| 0,225 | | | | | | | 0 |
| 0,200 | | | | | | | |
| 0,175 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 0,150 | | 0 | | | | | |
| 0,125 | | | | | | | |
| 0,100 | | | | | | | |

Berechnung:

1 ccm Originalserum $= \frac{10000}{0,6} = 16\,666$ A.-E.

1 » Z. I $= \frac{1000}{0,4} = 2\,500$ »

1 » Z. II $= \frac{1000}{0,5} = 2\,000$ »

1 » Z. III $= \frac{1000}{0,5} = 2\,000$ »

1 » Z. IV $= \frac{1000}{0,6} = 1\,666$ »

1 » Z. V $= \frac{1000}{0,7} = 1\,428$ »

1 » Z. VI $= \frac{1000}{0,8} = 1\,250$ »

Quotienten:

1. $\frac{16\,666-2\,750}{16\,666} = \mathbf{0,83}$
2. $\frac{2500-2200}{2500} = \mathbf{0,12}$
3. $\frac{2000-2000}{2000} = \mathbf{0}$
4. $\frac{1666-1570}{1666} = \mathbf{0,05}$
5. $\frac{1428-1375}{1428} = \mathbf{0,03}$

Verdünnungsversuch.

| Menge | $Z_2$ 1000 fach | $Z_3$ 100 fach | $Z_4$ 100 fach | $Z_5$ 10 fach | $Z_6$ | $Z_7$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | + + | | + + | | | |
| 0,9 | + + | | + | | | |
| 0,8 | + | | 0 | | | |
| 0,7 | + | + + | | + + | | |
| 0,6 | 0 | | | | + + | |
| 0,5 | | | | | | |
| 0,4 | | + + | | + + | | |
| 0,3 | | + | | + | | 0 |
| 0,25 | | 0 | 0 | + | + + | |
| 0,225 | 0 | | | 0 | + | |
| 0,200 | | | | | 0 | |
| 0,175 | | | | | | |
| 0,150 | | 0 | | 0 | 0 | |
| 0,125 | | | | | | |
| 0,100 | | | | | | |

Berechnung:

$Z_1 = Z.\,I.$

1 ccm $Z_2 = \frac{1000}{0{,}9} = 1111$ A.-E.

1 » $Z_3 = \frac{100}{0{,}4} = 250$ »

1 » $Z_4 = \frac{100}{1{,}0} = 100$ »

1 » $Z_5 = \frac{10}{0{,}4} = 25$ »

1 » $Z_6 = \frac{1}{0{,}25} = 4$ »

1 » $Z_7 = 0.$

Quotienten:

1. 0,83

2. $\frac{8333-1222}{8333} = 0{,}85$

3. $\frac{4166-275}{4166} = 0{,}93$

4. $\frac{2083-110}{2083} = 0{,}94$

5. $\frac{1041-27}{1041} = 0{,}97.$

**Übersichtstabelle IV.**

| Agglutinin-Einh. dargeboten | Absorptionsquotienten bei wiederholter Absorption | bei Verdünnung |
|---|---|---|
| 16 666 | 0,83 | 0,83 |
| 8 333 | — | 0,85 |
| 4 166 | — | 0,93 |
| 2 500 | 0,12 | — |
| 2 083 | — | 0,94 |
| 2 000 | 0,0 | — |
| 1 666 | 0,05 | — |
| 1 428 | 0,03 | — |
| 1 041 | — | 0,97 |

### Parallelversuch V.

Serum eines Kaninchens, das 5 Injektionen von Typhusaufschwemmung erhielt. Blutentnahme 10 Tage nach der letzten Injektion. Sofort nach der Entnahme geprüft.

Das Serum, 10 fach verdünnt, wird als »Originalserum« zu dem Versuche benutzt ($^1/_2$ % Karbolzusatz).

Bei dem »Verdünnungsversuche« werden die Verdünnungen nicht wie bisher mit Kochsalzlösung hergestellt, sondern mit dem 10 fach verdünnten Serum eines normalen Kaninchens; gleichzeitig wurde diesem Serum noch $^1/_2$ % Karbolsäure und 10 % Milchzucker zugesetzt.

Anordnung des Versuches im übrigen die gleiche.

Z. I usw. = wiederholte Absorption, $Z_1$ usw. = Verdünnungsversuch.

| Menge | Originalser 10000 fach | Z. I 1000 fach | Z. II 1000 fach | Z. III 1000 fach | Z. IV 1000 fach | $Z_2$ 1000 fach | $Z_3$ 1000 fach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | | | | | | + + | + + |
| 0,9 | | | | | | + + | + + |
| 0,8 | + + | | | | | + + | + + |
| 0,7 | | | | | | + + | + |
| 0,6 | | | | | | + + | 0 |
| 0,5 | + + | + + | + + | + + | + + | + + | |
| 0,4 | + | | | | | + | |
| 0,3 | 0 | | | | | | |
| 0,25 | | | | | | | |
| 0,225 | | | | | | | |
| 0,200 | | | | | + + | 0 | 0 |
| 0,175 | 0 | + + | + + | + + | + | | |
| 0,150 | | + | + | + | 0 | | |
| 0,125 | | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 0,100 | | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

a) Wiederholte Absorption:

Orig. 1 ccm $= \frac{10000}{0,5} = 20000$ A.-E.

Z. I 1 » $= \frac{1000}{0,175} = 5714$ »

Z. II 1 » $= \frac{1000}{0,175} = 5714$ »

Z. III 1 » $= \frac{1000}{0,175} = 5714$ »

Z. IV 1 » $= \frac{1000}{0,2} = 5000$ »

Quotienten:

1. $\frac{20000-6285}{20000} =$ **0,68**
2. **0,0**
3. **0,0**
4. $\frac{5714-5500}{5714} =$ **0,04**

b) Verdünnungsversuch:

$Z. I = Z_1$

$Z_2$ 1 ccm $= \frac{1000}{0,5} = 2000$ A.-E.

$Z_3$ 1 » $= \frac{1000}{0,8} = 1250$ »

Quotienten:

1. 0,68

2. $\frac{10000-2200}{10000} = 0,78$

3. $\frac{5000-1375}{5000} = 0,73.$

**Übersichtstabelle V.**

| Agglutinin-Einh. dargeboten | Absorptionsquotienten bei wiederholter Absorption | bei Verdünnung |
|---|---|---|
| 20 000 | 0,68 | 0,68 |
| 10 000 | — | 0,78 |
| 5 714 | 0,00 | — |
| 5 714 | 0,00 | — |
| 5 714 | 0,04 | — |
| 5 000 | — | 0,73 |

Die Ergebnisse dieser Agglutininversuche sind nun recht interessant. Betrachten wir zunächst die beiden ersten Experimente, die mit dem vom Pferde herstammenden Typhusserum »Edgar« angestellt wurden, und deren Resultate sich in den Übersichtstabellen I und II verzeichnet finden. Ein Vergleich der beiden vertikalen Stäbe, welche die Absorptionsquotienten enthalten, lehrt sofort, dafs bei beiden Versuchsserien ein deutliches Anwachsen dieser Quotienten mit abnehmender Menge der zur Absorption dargebotenen Agglutinineinheiten stattfindet. Trotzdem läfst sich ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Versuchsreihen nicht verkennen, denn der Anstieg der Absorptionsquotienten ist bei den »Verdünnungsversuchen« ein bei weitem rascherer als bei den Experimenten mit wiederholter Absorption. Während z. B. noch Tabelle II bei einer Verminderung der Zahl der dargebotenen Agglutinineinheiten von 2100 auf 800 der Absorptionsquotient für die »wiederholte Absorption« noch unverändert 0,56 geblieben ist, liegt er für den »Verdünnungsversuch« bereits zwischen 0,82 und 0,94; und während bei einer weiteren Abnahme auf 266 dargebotene Agglutinineinheiten bei den Verdünnungsversuchen fast vollkommene Absorption (Quotient 0,99)

eingetreten ist, beträgt der Quotient bei der Parallelreihe noch wenig über 0,7. —

Viel ausgeprägter als bei diesem, bereits mehrere Jahre alten Pferdeimmunserum sind jedoch die Unterschiede beider Versuchsreihen bei den frischen vom Kaninchen stammenden Serumproben. Die Übersichtstabellen III—V geben hierüber deutlichen Aufschlufs. In allen drei Fällen beobachten wir nach der ersten Absorption ein rapides Absinken der Quotienten, die sich dann, bei jeder weiteren Absorption immer mehr der 0 nähern, derart, dafs tatsächlich bei einzelnen Versuchen mit der angewandten Methode kein Agglutininverlust mehr nachzuweisen war bzw. dessen Bestimmung bereits innerhalb der nicht unbeträchtlichen Fehlergrenzen zu liegen kam. So finden wir z. B. in Tabelle IV, dafs sich der Absorptionsquotient nach der ersten Berührung des Serums mit der Bazillenaufschwemmung von 0,83 plötzlich auf 0,12 vermindert und sich im Verlauf der weiteren Absorptionen bis auf 0,03 bzw. 0 reduziert. Bei der Parallelreihe dagegen erhebt sich der Absorptionsquotient mit steigender Verdünnung sukzessive bis auf 0,97, so dafs sich also für die Zahl von 1428 dargebotenen Agglutinineinheiten die Quotienten von 0,03 und 0,97 unvermittelt gegenüberstehen, d. h. hier fast vollkommene Absorption zu verzeichnen ist, dort die dargebotene Agglutininmenge fast unberührt bleibt.

### 3. Diskussion der Versuchsergebnisse.

Fassen wir nunmehr das Resultat sowohl der Agglutinin- wie der Hämolysinversuche zusammen, so können wir dasselbe ungefähr folgendermafsen formulieren: stets zeigte sich bei den Verdünnungsversuchen ein Anwachsen oder wenigstens ein Konstantbleiben der Absorptionsquotienten mit zunehmender Verdünnung. Bei den Experimenten mit wiederholter Absorption dagegen war das Resultat ein verschiedenes, insofern als bald, wie bei den Haemolysinversuchen und bei den Versuchen mit frischem Kaninchenimmunserum, eine Abnahme der Quoti-

enten beobachtet wurde, bald jedoch, wie beim Typhuspferdeserum, zwar mit der Wiederholung der Absorption eine Erhöhung derselben eintrat, die jedoch stets hinter derjenigen beträchtlich zurückblieb, die ceteris paribus, d. h. bei gleicher Menge der dargebotenen Agglutinineinheiten, bei den Verdünnungsversuchen zustande kam.

Mit anderen Worten: bei allen diesen Versuchen zeigte sich, dafs die Absorption eine weniger vollständige war, wenn die Verminderung der dargebotenen Antikörpermengen durch wiederholte Absorption bewirkt wurde, als wenn dieselbe durch passende Verdünnung des Ausgangsserums erzielt worden war.

Wie hat man nun diese auffälligen Differenzen zu erklären?

Zwei verschiedenartige Momente, an welche man vielleicht hierbei denken könnte, haben wir bereits im vorigen erwähnt, und als nicht in Betracht kommend, auf experimentellem Wege ausgeschlossen: Dafs die Konzentration der Serumbestandteile als solche keine Rolle spielen könne, hatten die Kontrollversuche ergeben, bei welchen nicht mit Kochsalzlösung sondern mit entsprechend verdünntem Normal-Kaninchenserum verdünnt worden war, derart, dafs beide Versuchsreihen in gleich stark serumhaltigen Lösungen sich abspielten. Dafs dagegen die bei wiederholter Absorption mit dem öftermaligen Bakterienzusatz eingeführten Milchzucker- und Karbolsäuremengen irrelevant sind, hatten die Experimente gezeigt, bei welchen den Proben des »Verdünnungsversuches« gröfsere Milchzucker- und Karbolsäuremengen zugesetzt worden waren. Überdies kam ja dieser Erklärungsmodus für die hämolytischen Versuche, bei welchen ja zur Absorption einfach in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Blutkörperchen ohne jeden weiteren Zusatz benutzt wurden, von vornherein nicht in Betracht.

Hingegen scheint mir noch eine andere Art der Erklärung zum mindesten diskutabel, nämlich die, dafs mit dem wiederholten Zusatz der geformten Elemente zum Serum Stoffe in

dasselbe eingeführt würden, welche die Fähigkeit hätten, die Absorption der Antikörper in irgendeiner nicht näher zu charakterisierenden Weise zu hemmen. Für die Bakterienaufschwemmung könnte diese Möglichkeit wohl zugegeben werden, zumal ja hier eine längerdauernde Auslaugung bzw. Autolyse der Bakterienleiber vor sich gehen dürfte, die derartige Stoffe in Freiheit setzen könnte. Viel geringer ist allerdings die Wahrscheinlichkeit hierfür bei den hämolytischen Versuchen, wo ja stets frisches Blut in mehrfach gewaschenem Zustande benutzt wird, und während des kurzen Kontaktes mit dem Immunserum wohl kaum Gelegenheit haben dürfte, solche hemmenden Stoffe zu bilden bzw. an dasselbe abzugeben.

Unmöglich wäre natürlich aber auch dies nicht; trotzdem aber erscheint mir die eben diskutierte Erklärung nicht zulässig, und zwar aus folgendem Grunde: Da nämlich schon bei der ersten Absorption diese supponierten hemmenden Substanzen mit den Blutkörperchen bzw. Bakterien in das Immunserum eingeführt werden, also bereits hier in Aktion treten müssen, so könnte der Effekt der zweiten Absorption nur in einer entsprechenden Verstärkung der schon das erste Mal auftretenden Hemmung bestehen, sich also etwa in einem geringen Zurückbleiben des Absorptionsquotienten äufsern, nie aber einen so plötzlichen jähen Absturz desselben hervorrufen, wie wir ihn bei dem frischen Kaninchenserum beobachtet haben. Auch wäre es schwer verständlich, warum diese hypothetischen Hemmungsstoffe bei den beiden untersuchten Serumarten, dem Pferdeserum und dem Kaninchenserum, so sehr verschiedene Wirkungen hervorgerufen haben sollten.

Nach alledem möchte ich also für die wahrscheinlichste Erklärung unsers Phänomens die halten, von welcher wir in der Einleitung zu dieser Arbeit ausgegangen waren: nämlich dafs dasselbe in der Anwesenheit verschieden avider Antikörper in dem Immunserum seinen Grund hat, derart, dafs bei den ersten Absorptionen die Fraktionen höchster Affinität aus demselben

entfernt werden und immer weniger avide Immunstoffe zurückbleiben, welche demgemäfs auch immer niedrigere Absorptionsquotienten liefern.

Wir werden im weiteren Verlaufe dieser Arbeit noch anderen Tatsachen begegnen, welche für die Richtigkeit dieser Auffassung sprechen.

Den abweichenden Verlauf dieser Absorptionsquotientenkurve bei den verschiedenen untersuchten Serumarten kann man nach dem gegebenen Erklärungsprinzipe ohne Schwierigkeit verstehen, wenn man die gewifs plausible und erlaubte Annahme macht, die dieselben die Komponenten verschiedener Avidität in sehr verschiedenen Mischungsverhältnissen und Mengen enthalten.

Nehmen wir z. B. an, ein Serum enthalte blofs zwei Gruppen von Agglutininen, deren eine durch maximale Avidität zu den Bakterienleibern ausgezeichnet wäre, während die andere für dieselben nur eine sehr geringe Affinität besäfse, so müfste bereits nach der ersten vollzogenen Absorption, welche die Hauptmasse der avidesten Elemente aus dem Serum entfernt, der charakteristische Quotient einen sehr kleinen Wert annehmen, also ein Absturz der Kurve erfolgen, wie wir ihn bei den Kaninchenseren beobachtet haben.

Wären hingegen in dem Serum Antikörper vorhanden, welche die verschiedensten Zwischenstufen der Avidität repräsentieren, so würde die absolute oder relative Abnahme der Absorptionsquotienten nicht so plötzlich erfolgen, sondern mehr allmählich eintreten, wofür die Hämolysinversuche und die Experimente mit dem Pferdeimmunserum ein Beispiel geben.

Ob dabei eine wirkliche Verkleinerung der Absorptionsquotienten zustande kommt oder ob dieselben nur hinter den beim »Verdünnungsversuch« beobachteten zurückbleiben, das hängt dann natürlich von der Schwankungsbreite ab, innerhalb welcher sich die Affinitäten der Antikörper bewegen. Denn sind die Affinitätsunterschiede der verschiedenen Komponenten sehr geringe, dann wird die Verminderung der Absorptionsgröfse, die bei wiederholtem Bakterienzusatz eintritt, durch den Einflufs wettgemacht, welche die geringere Menge der zur Absorption

dargebotenen Antikörper ausübt, und das Resultat wird ein, wenn auch langsameres Ansteigen der Kurve sein.

So werden also von unserem Standpunkte aus die erhobenen Befunde ganz leicht verständlich.

Auf ein weiteres Moment möchte ich bei dieser Gelegenheit sofort hinweisen, weil dasselbe gleichfalls einen merklichen Unterschied in den Eigenschaften unserer beiden Typhusimmunsera erkennen läfst und augenscheinlich ebenfalls mit den Aviditätsverhältnissen in Zusammenhang steht. Vergleicht man nämlich diejenigen Mengen dargebotener Agglutinineinheiten, bei welchen die Absorptionsquotienten im Verdünnungsversuch eben einen bestimmten Wert — sagen wir z. B. den Wert 0,9 — erreichen und stellt man die so erhaltenen Zahlen, wie in der nachstehenden Tabelle geschehen ist, nebeneinander, so ergibt sich folgendes:

**Quotient 0,9.**

| Zahl der Agglutin.-Einheiten dargeboten: | Pferde-immunserum: | Kaninchen-immunserum: |
|---|---|---|
| | ca. 800 (Tab. II) | 31 000 (Tab. III) |
| | ca. 150 (Tab. I) | ca. 6000 (Tab. IV) |

In Worten ausgedrückt heifst das aber nichts anderes als dafs man, um einen gleichen Absorptionsgrad zu erreichen, viel weniger von dem Pferdeimmunserum zu einer gegebenen Bakterienmenge zusetzen darf als von dem Kaninchenserum, woraus man weiter folgern mufs, dafs dem letzteren eine höhere Affinität zukommt als dem ersteren. Es braucht wohl kaum betont zu werden, dafs diese Schlufsfolgerung natürlich nur für die von uns untersuchten Sera, speziell für das jahrelang gelagerte Pferdeserum Gültigkeit haben kann, und dafs besonders zu untersuchen wäre, wie sich frisches Immunserum vom Pferde in dieser Beziehung verhält. Denn es ist ja der Gedanke aufserordentlich naheliegend, dafs die relativ geringere Bindungsavidität des Pferdeagglutinins nichts Primäres darstellen, sondern erst im Laufe der Zeit durch Abschwächung entstanden sein könnte.

Die mannigfaltigen Erfahrungen, die man über die Abschwächung wirksamer Sera, über die Entstehung von weniger aviden oder von unwirksamen, aber noch bindungsfähigen Modifikationen der Antikörper zu sammeln Gelegenheit hatte, würden diese Auffassung jedenfalls wesentlich unterstützen.

Damit sind wir aber bei einer weiteren Frage angelangt, die für unsere Affinitätsstudien von gröfster Wichtigkeit sein mufste. Wir haben hervorgehoben, dafs wir wenigstens einen Teil unserer Versuche mit Immunseris anstellten, denen zum Zwecke der Konservierung ½proz. Karbolsäure zugesetzt wurde. Da nun dieser Zusatz, wie der von anderen chemisch wirksamen Substanzen, von Säuren und Alkalien usw. bekanntermafsen imstande ist, die Antikörper schädlich zu beeinflussen, abzuschwächen oder sogar völlig zu zerstören, so mufsten wir uns notgedrungen die Frage vorlegen, ob denn die Aviditätsunterschiede, die wir bei den verschiedenen Fraktionen der Antikörper eines Serums annehmen mufsten, schon in dem letzteren vorgebildet seien oder etwa erst durch die Einwirkung der zugesetzten Karbolsäure und partielle Schädigung der Immunkörper künstlich hervorgerufen seien.

Gewifs wäre auch die letztere Eventualität, dafs also ein Teil der Antikörper unter dem Einflusse des Karbolsäurezusatzes an Avidität eingebüfst hätte, nicht ohne Interesse gewesen. Viel bedeutsamer dagegen mufste es sein, wenn die genannten Aviditätsdifferenzen schon in dem frisch entnommenen, noch möglichst unveränderten Serum nachgewiesen werden konnten; denn dann hatten wir es mit einer Erscheinung von eminent biologischem Gepräge zu tun, deren weitere Verfolgung gewisse Aufschlüsse über den Mechanismus der Antikörperproduktion erhoffen liefs.

Nun haben wir, wie aus den früher mitgeteilten Protokollen hervorgeht, auch einige Versuche ohne jeden Karbolzusatz zu dem hämolytischen oder agglutinierenden Serum angestellt (hämol. Versuch I, Parallelversuch I, Agglutinat.-Versuch III) und haben hierbei genau das gleiche Resultat zu verzeichnen gehabt wie bei den übrigen Experimen-

ten, so dafs also in der Tat an der Präexistenz der beobachteten Aviditätsunterschiede nicht gezweifelt werden kann. Dasselbe lehrt auch der folgende, mit unvermischtem frischem Kaninchenserum angestellte Versuch, den wir hier besonders mitteilen, und die ganze Reihe der späteren, zu anderen Zwecken ausgeführten Experimente.

Versuch.

a) Serum eines Kaninchens, das 5 Injektionen intraperitoneal, die Typhusaufschwemmung erhalten hatte. Ohne Karbolzusatz.

10 ccm Vollserum + 1 ccm Typhusaufschw. ergibt Z. I
5 » Z. I + 0,5 » » » Z. II

Titer:

$$1 \text{ ccm Vollserum} = \frac{1\,000\,000}{0,2} = 5\,000\,000 \text{ A.-E.}$$

$$1 \text{ » Z. I} = \frac{1\,000\,000}{0,4} = 2\,500\,000 \text{ »}$$

$$1 \text{ » Z. II} = \frac{1\,000\,000}{0,4} = 2\,500\,000 \text{ »}$$

Quotienten: 1. $\frac{500-275}{500} = \mathbf{0,45}$

2. $= \mathbf{0,0}.$

b) Serum desselben Tieres, 100fach verdünnt, ohne Karbol.

15 ccm Serum + 1,5 ccm Typhusaufschw. ergibt Z. I
10 » Z. I + 1,0 » » » Z. II

Titer:

$$1 \text{ ccm Serum} = \frac{10\,000}{0,2} = 50\,000 \text{ A.-E.}$$

$$1 \text{ » Z. I} = \frac{1000}{0,8} = 1\,250 \text{ »}$$

$$1 \text{ » Z. II} = \frac{1000}{0,8} = 1\,250 \text{ »}$$

Quotienten: 1. $\frac{50\,000-1375}{50\,000} = \mathbf{0,97}$

2. $= \mathbf{0,0}.$

c) Dasselbe Serum 5000 f. verdünnt.

15 ccm Serum + 1,5 Typhusaufschw. = Z. I
10 » Z. I + 1,0 » = Z. II

Titer:

$$1 \text{ ccm Serum} = \frac{100}{0,1} = 1000 \text{ A.-E.}$$

$$1 \text{ » Z. I} = \frac{10}{0,3} = 33 \text{ »}$$

$$1 \text{ » Z. II} = 0 \text{ A.-E.}$$

Quotienten: 1. $\frac{1000-36}{1000} = 0,96$

2. $= 1,0.$

Wie man sieht, führt auch hier die zweite Beschickung des Serums mit Bakterienleibern, praktisch genommen, zu keinem Agglutininverlust mehr, daher der Absorptionsquotient denn auch von 0,95 bzw. 0,97 plötzlich auf 0 absinkt. Natürlich ist damit nicht gesagt, dafs nun auch wirklich gar keine Agglutininbindung eingetreten sei — dem widerspricht ja schon die prompt eintretende Agglutination. Aber die Absorption ist offenbar so gering, dafs sie bei der immerhin ziemlich ungenauen Prüfungsmethode nicht mehr zum Ausdruck kommt. Eine einfache rechnerische Überlegung würde zeigen, dafs dabei die Zahl der gebundenen Agglutinineinheiten absolut genommen gar nicht einmal eine so sehr kleine zu sein brauchte.

So ergibt sich also der für uns aufserordentlich wichtige Schlufs, dafs die im Serum enthaltenen, durch Vorbehandlung mit Erythrozyten oder mit Bakterienkulturen erzeugten Antikörper grofse Aviditätsunterschiede aufweisen, und es tritt somit die weitere Frage an uns heran, wie diese Unterschiede zu erklären sind und was ihnen für eine biologische Bedeutung zukommen kann.

Welche Möglichkeiten liegen nun für die Entstehung solcher Aviditätsdifferenzen vor?

Bedenken wir zunächst, dafs nach den Anschauungen wohl der meisten Immunitätsforscher die Antikörper eines Immunserums fast niemals einheitlicher Natur sind, sondern aus zahlreichen Partialantikörpern mit etwas verschiedenen Eigenschaften und Angriffspunkten an den betreffenden Antigenen zusammengesetzt sind, so könnten wir also annehmen, dafs diese Auffassung auch für die Aviditätsverhältnisse Geltung habe, und demgemäfs die folgenden Eventualitäten unterscheiden:

1. Die Antikörper sind in ihren haptophoren Gruppen verschieden, beziehen sich also auf verschiedene Rezeptorgruppen der betreffenden, zur Immunisierung verwendeten Zellen. Da wir es also in diesem Falle tatsächlich mit ganz differenten

Immunkörpern zu tun hätten, die nur gewissermafsen zufälligerweise infolge des komplexen Baus der Erythrozyten und Bakterienzellen gleichzeitig nebeneinander entstehen und im Serum auftreten, so wäre es wohl nicht weiter auffällig, wenn sich dieselben auch in ihren Bindungsaffinitäten voneinander mehr oder minder beträchtlich unterscheiden würden.

2. Es wäre aber auch denkbar, dafs die Antikörper zwar in ihren haptophoren Gruppen miteinander identisch wären, sich aber in ihrem sonstigen chemischen Aufbau verschieden verhalten würden; auch in diesem Falle wäre eine Verschiedenheit in den Affinitäten nur als notwendige Folge der differenten chemischen Konstitution anzusehen und nicht weiter verwunderlich. Die Anwesenheit derartig verschieden gebauter Antikörper in dem Serum würde man dabei am einfachsten in der Weise zu erklären haben, dafs man für dieselben verschiedene Entstehungsorte in Anspruch nimmt. Wissen wir ja doch, dafs nicht nur die lymphoiden Organe, Milz, Lymphdrüsen und Knochenmark, sondern auch eine ganze Reihe anderer Organe und Gewebe zur Produktion der Antikörper befähigt ist, und ist es doch gewifs naheliegend, anzunehmen, dafs diese letzteren, selbst wenn sie gleiche haptophore Gruppen besitzen, doch je nach ihrer Provenienz gewisse Verschiedenheiten in ihrem Aufbau zeigen werden, welche für die Aviditätsverhältnisse von Bedeutung sein müssen.

3. Endlich wäre es aber auch möglich, dafs zwar die betreffenden Antikörper den gleichen Bildungsstätten entstammen und auf dieselben Rezeptorgruppen eingestellt sind, dafs aber im Verlaufe der Immunisierung eine Änderung der Affinitätsverhältnisse eintritt, derart, dafs die aus verschiedenen Zeitperioden stammenden Produkte, die sich ja wenigstens zum Teil gleichzeitig im Serum vorfinden müssen, verschiedene Avidität zu ihren Antigenen aufweisen. Auf gewisse Analogien, welche diese Erklärungsweise an bestimmten, bereits in der Literatur vorliegenden Tatsachen finden würde, soll später eingegangen werden. Jedenfalls würde aber auch hier als Grundursache der Aviditäts-

unterschiede eine Verschiedenheit des chemischen Aufbaus anzunehmen sein, so dafs also ein und dasselbe Zellgebiet, je nach der Dauer der immunisatorischen Vorbehandlung, etwas different konstituierte Antikörper liefern würde.

4. Natürlicherweise steht auch der Annahme nichts im Wege, dafs gleichzeitig mehrere der erwähnten Eventualitäten realisiert sind; ist es doch zweifellos sichergestellt, dafs jedes Immunserum eine ganze Schar von Partialantikörpern enthält, die teils verschiedene Angriffspunkte an dem antigenetischen Zellmateriale finden, teils aus verschiedenen Zellterritorien stammen, eine Tatsache, welche natürlicherweise die Analyse des vorliegenden Phänomens sehr erschwert.

## 4. Versuche mit intravenöser Bakterieninjektion.

Um zunächst darüber Aufschlufs zu erlangen, ob vielleicht der Ort der Applikation der Bazillenmasse von Einflufs auf die Ausbildung der Affinitätsunterschiede ist, die an den Agglutininen zur Beobachtung kamen, wurden einige Versuche angestellt, bei welchen nicht, wie bisher, der intraperitoneale, sondern der intravenöse Infektionsmodus gewählt wurde.

Da nämlich bei der Einspritzung in die Bauchhöhle die Antigene vor ihrer Resorption in die Blutbahn mit den bindegewebigen und lymphoiden Apparaten des Netzes und der Bauchorgane in einige Berührung treten und diese Elemente sich nachgewiesenermafsen an der Produktion der Antikörper beteiligen, so war es von vornherein nicht ganz auszuschliefsen, dafs bei der intravenösen Applikation, bei welcher also die Bauchhöhle umgangen wird, vielleicht andere Verhältnisse bestehen könnten, und speziell Agglutinine von einheitlicherer Affinität gebildet würden.

Wie jedoch die nachfolgenden Versuchsprotokolle erweisen, war auf diesem Wege ein entscheidender Aufschlufs nicht zu erlangen. Denn auch diese Experimente ergaben, wie die früher geschilderten, sehr deutlich das Phänomen des Quotientenabfalls bei wiederholter Absorption, liefsen also die Anwesenheit von

Agglutininen sehr verschiedener Avidität erkennen, die ebensogut aus verschiedenen Zellterritorien stammen konnten, wie die bei intraperitonealer Einspritzung entstehenden.

Da nun eine verschiedene Provenienz der Antikörper als Ursache der beobachteten Affinitätsunterschiede selbst dann nicht mit voller Sicherheit als ausgeschlossen betrachtet werden konnte, wenn es selbst gelungen wäre, die Antikörperproduktion auf ein einziges Organ zu beschränken — konnten ja noch immer die einzelnen Gewebsbestandteile dieses Organs verschiedene Produkte liefern —, so wurde von einer weiteren Verfolgung dieses Gedankenganges Abstand genommen und versucht, der Lösung unserer Frage in anderer Weise näherzukommen.

Kaninchen a, das 4 intravenöse Injektionen von 0,5 bzw. 1,0 ccm Typhusaufschwemmung erhalten hatte, und zwar in Abständen von je 7 Tagen. (Tier deutlich abgemagert.)

Quotienten:

a) 1 ccm Vollserum $= \frac{25\,000}{0,5} = 50\,000$ A.-E. — 1. $\frac{50\,000-36\,666}{50\,000} = \mathbf{0,27}$

1 » Z. I $= \frac{10\,000}{0,3} = 33\,333$ » — 2. $\frac{33\,333-27\,500}{33\,333} = \mathbf{0,17}$.

1 » Z. II $= \frac{10\,000}{0,4} = 25\,000$ »

b) 1 ccm Serum 50 fach = 1000 A.-E. — Quotienten:

1 » Z. I $= \frac{10}{0,2} = 50$ » — 1. $\frac{1000-55}{1000} = \mathbf{0,94}$

1 » Z. II $= \frac{10}{0,5} = 20$ » — 2. $\frac{55-22}{55} = \mathbf{0,60}$.

c) 1 ccm Serum 1000 f. = 50 A.-E. — Quotienten:

1 » Z. I $= \frac{1}{0,6} = 1,66$ » — 1. $\frac{50-1,66}{50} = \mathbf{0,97}$

1 » Z. II $= \frac{1}{0,9} = 1,11$ » (unsicher) — 2. $\frac{1,66-1,22}{1,66} = \mathbf{0,26}$.

Kaninchen b, 5 intravenöse Injektionen; Tier erscheint vollkommen gesund.

a) Serum 5 fach verdünnt.

1 ccm Serum 5 fach $= \frac{500}{0,225} = 2222$ A.-E. — Quotienten:

1 » » Z. I $= \frac{250}{0,2} = 1250$ » — 1. $\frac{2222-1370}{2222} = \mathbf{0,38}$

1 » » Z. II $= \frac{250}{0,3} = 833$ » — 2. $\frac{1250-916}{1250} = \mathbf{0,26}$.

b) Serum 50 fach = 222 A.-E.

1 ccm » Z. I $= \frac{25}{0,4} = 62,5$ A.-E.

1 » » Z. II $= \frac{10}{0,7} = 14,3$ »

Quotienten:

1. $\frac{222-68,7}{222} = 0,69$

2. $\frac{62,5-15,7}{62,5} = 0,74$.

Kaninchen c, 5 intravenöse Injektionen.

a) Serum 5 fach verdünnt.

1 ccm Serum $= \frac{500}{0,225} = 2222$ A.-E.

1 » Z. I $= \frac{500}{0,4} = 1250$ »

1 » Z. II $= \frac{500}{0,4} = 1250$ »

Quotienten:

a) $\frac{2222-1370}{2222} = 0,38$

b) $= 0,0$.

b) Serum 50 fach.

1 ccm Serum 50 fach = 222 A.-E.

1 » Z. I $= \frac{50}{0,6} = 83,3$ »

1 » Z. II $= \frac{5}{0,5} = 10$ »

Quotienten:

a) $\frac{222-91}{222} = 0,59$

b) $\frac{83-11}{83} = 0,86$.

## 5. Änderung der Absorptionsquotienten im Verlauf der Immunisierung.

Ich legte mir nämlich die Frage vor, wie sich denn die Absorptionsquotienten im Verlaufe der Immunisierung verhalten, ob sie ceteris paribus, d. h. bei gleichem Agglutiningehalt auch stets den gleichen Wert beibehielten, oder ob sich derselbe mit der Zeit und mit der Anzahl der verabreichten Bakterieninjektionen etwa gesetzmäfsig verändert.

Da bei diesen Versuchen eine sehr oft wiederholte, nicht allzuspärlich bemessene Blutentnahme notwendig war, so trug ich Bedenken, diese ganze Serie von Experimenten an je einem einzigen Tiere von Anfang bis zu Ende durchzuführen; ich nahm vielmehr von Anfang an 5 ungefähr gleichschwere Kaninchen in Behandlung, welchen abwechselnd jede Woche einmal Blut aus den Ohrvenen entnommen und gleich darauf 0,5 ccm Bazillenaufschwemmung in die Bauchhöhle injiziert wurde; ebenso wurden die übrigen 4 Tiere, welche kein Blut geliefert hatten, im Anschlufs daran mit der gleichen Bazillenmenge eingespritzt.

Wie sich im Verlauf dieser Untersuchungen herausstellte, waren die individuellen Unterschiede, die sich bei erwähnten 5 Tieren ergaben, so geringfügige, dafs keinerlei Schwierigkeit bestand, die erhaltenen Zahlen zu einem einheitlichen Bilde von dem Verlauf der Absorptionsquotienten zusammenzufügen.

Die Absorptionsversuche wurden anfänglich mit dem Vollserum, später aber, als der Agglutinationstiter bereits höhere Werte angenommen hatte, mit verschiedenen Serumverdünnungen angestellt, da, wie wir ja wissen, die Absorptionsquotienten wesentlich durch die Zahl der dargebotenen Agglutinineinheiten bestimmt werden und daher nur solche Werte miteinander verglichen werden können, welche unter ungefähr gleichen Absorptionsbedingungen gewonnen wurden.

Ich lasse nun zunächst die stark gekürzten Versuchsprotokolle folgen, deren Ergebnisse zum Schlusse in zwei Übersichtstabellen derart zusammengefafst sind, dafs die Quotienten, welche einer Zahl von 1—10; 10—100, 100—1000, 1000—10000, 10000—100000 dargebotenen Agglutinineinheiten entsprechen, in je einem vertikalen Stab vereinigt sind.

5 Kaninchen werden fortlaufend mit einer karbolisierten Aufschwemmung von Typhusbazillen intraperitoneal behandelt. Von Zeit zu Zeit Blutentnahme aus der Ohrvene und Anstellung eines Absorptionsversuches, event. mit verschiedenen Verdünnungsgraden des Serums (ohne Karbolzusatz).

| Injektionen: | Blutentnahmen: |
|---|---|
| 18. III. | 2. IV. |
| 27. » | 8. » |
| 2. IV. | 17. » |
| 9. » | 26. » |
| 17. » | |
| 26. » | |

Kan. III nach der 1. Injektion. Vollserum.

27. III.

$1 \text{ ccm Serum} = \frac{1}{0,3} = 3,3$ A.-E.

$1$ » Z. I $= \frac{1}{0,5} = 2,0$ »

$1$ » Z. II $= \frac{1}{0,6} = 1,7$ »

Quotienten:

1. $\frac{3,3-2,2}{3,3} = \mathbf{0,33}$

2. $\frac{2,0-1,8}{2,0} = \mathbf{0,10}.$

27. III. Kan. V. nach der 1. Injektion.

1 ccm Serum $= \frac{100}{0{,}3} = 333$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{100}{0{,}4} = 250$ ›

1 › Z. II $= \frac{100}{0{,}5} = 200$ ›

Quotienten:

1. $\frac{333-275}{333} = \mathbf{0{,}17}$

2. $\frac{250-220}{200} = \mathbf{0{,}15}$.

Kan. V. nach der 2. Injektion (ausnahmsweise 12 Tage danach).

a) 1 ccm Serum $= \frac{1000}{0{,}4} = 2500$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{1000}{0{,}6} = 1666$ ›

1 › Z. II $= \frac{1000}{0{,}7} = 1428$ ›

Quotienten:

1. $\frac{2500-1832}{2500} = \mathbf{0{,}26}$

2. $\frac{1666-1570}{2500} = \mathbf{0{,}03}$.

b) Serum 10 fach verdünnt.

1 ccm Serum verd. $= 250$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{100}{0{,}8} = 125$ ›

1 › Z. II $= \frac{10}{0{,}15} = 66$ ›

Quotienten:

1. $\frac{250-137}{250} = \mathbf{0{,}45}$

2. $\frac{125-72}{125} = \mathbf{0{,}42}$.

2. IV. 07. Kan. I nach der 2. Injektion. Serum 10 fach verdünnt.

1 ccm Serum $= \frac{10}{0{,}15} = 66{,}6$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{10}{1} = 10{,}0$ ›

1 › Z. II $= \frac{1}{0{,}5} = 2{,}0$ ›

Quotienten:

1. $\frac{66{,}6-11}{66{,}6} = \mathbf{0{,}83}$

2. $\frac{10-2{,}2}{10} = \mathbf{0{,}78}$.

8. IV. Kan. II nach der 3. Injektion.

a) Serum 5 fach verdünnt.

1 ccm Serum verd. $= 1000$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{100}{0{,}2} = 500$ ›

1 › Z. II $= \frac{100}{0{,}3} = 333$ ›

Quotienten:

1. $\frac{1000-550}{1000} = \mathbf{0{,}45}$

2. $\frac{500-366}{500} = \mathbf{0{,}25}$.

b) Serum 50 fach verdünnt.

1 ccm Serum verd. $= 100$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{10}{0{,}4} = 25$ ›

1 › Z. II $= \frac{10}{1} = 10$ ›

Quotienten:

1. $\frac{100-27}{100} = \mathbf{0{,}73}$

2. $\frac{25-11}{25} = \mathbf{0{,}56}$.

c) Serum 500 fach verdünnt.

1 ccm Serum verd. $= 10$ A.-E.

1 › Z. I $= \frac{1{,}0}{0{,}9} = 1{,}1$ ›

1 › Z. II $= 0$ (unsicher)

Quotienten:

1. $\frac{10-1{,}2}{10} = \mathbf{0{,}88}$

2. $\frac{1{,}1-0}{1{,}1} = \mathbf{1{,}0}$ (unsicher).

17. IV. Kan. III nach der 4. Injektion.

a) 1 ccm Serum 10fach verd. = 200 A.-E. Quotienten:

1 ccm Z. I $= \frac{10}{0,15} =$ 66,6 » 1. $\frac{200-73,2}{200} =$ **0,63**

1 » Z. II $= \frac{10}{1,0} =$ 10 » 2. $\frac{66,6-11}{66,6} =$ **0,83.**

b) 1 ccm Serum 100fach verd. = 20 A.-E.

1 » Z. I = 0 Quotient: **1,0.**

c) 20fach verdünnt = 100 A.-E. Quotienten:

1 ccm Z. I $= \frac{10}{1,0} =$ 10 » 1. $\frac{100-11}{100} =$ **0,89**

1 » Z. II $= \frac{1}{0,5} =$ 2 » 2. $\frac{10-2,2}{10} =$ **0,78.**

26. IV. Kan. IV nach der 5. Injektion.

a) Serum 10fach verd. = 25000 A.-E. Quotienten:

1 ccm Z. I $= \frac{1000}{0,4} =$ 2500 » 1. $\frac{25000-2750}{2500} =$ **0,89**

1 » Z. II $= \frac{1000}{0,5} =$ 2000 » 2. $\frac{2500-2200}{2500} =$ **0,12.**

b) 1 ccm Serum 100fach = 2500 A.-E. Quotienten:

1 » Z. I $= \frac{100}{0,6} =$ 166 » 1. $\frac{2500-182}{2500} =$ **0,92**

1 » Z. II $= \frac{100}{1,1} =$ 99 » 2. $\frac{166-108}{166} =$ **0,34.**

c) 1 ccm Serum 400 f. = 625 A.-E. Quotienten:

1 » Z. I $= \frac{10}{0,8} =$ 12,5 » 1. $\frac{625-14}{625} =$ **0,97**

1 » Z. II $= \frac{1}{0,5} =$ 2 » 2. $\frac{12,5-2,2}{12,5} =$ **0,82**

d) 1 ccm Serum 1200 f. = 208 A.-E. Quotienten:

1 » Z. I $= \frac{1}{0,6} =$ 1,6 » 1. $\frac{208-1,7}{208} =$ **0,99**

1 » Z. II $= \frac{1}{1,1} =$ 0,9 (unsich.) 2. $\frac{1,6-1,0}{1,6} =$ **(0,37).**

e) 1 ccm Serum 10000 f. = 25 A.-E. Quotient:

1 » Z. I $= \frac{1}{0,6} =$ 1,6 » $\frac{25-1,7}{25} =$ **0,93.**

**I. Quotienten der ersten Absorption.**

| Zahl der Injektion | Zahl der dargebotenen Agglutinineinheiten | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1–10 | 10–100 | 100–1000 | 1000–10 000 | 10 000–100 000 |
| 1 | 0,33 | — | 0,17 | — | — |
| 2 | — | — | 0,45 | 0,26 | — |
| 3 | 0,88 | 0,73 | 0,45 | — | — |
| 4 | 1,0 | 0,89 | 0,63 | — | — |
| 5 | — | 0,93 | 0,98 | 0,92 | 0,89 |

II. **Quotienten der zweiten Absorption.**

| Zahl der Injektion | Zahl der dargebotenen Agglutinineinheiten | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1—10 | 10—100 | 100—1000 | 1000—10 000 |
| 1 | 0,1 | — | 0,15 | — |
| 2 | — | 0,42 | — | 0,03 |
| 3 | — | 0,56 | 0,25 | — |
| 4 | 0,78 | 0,83 | — | — |
| 5 | — | 0,82 | 0,34 | 0,12 |

Betrachtet man nun die Übersichtstabelle I, welche die Quotienten der ersten Absorption enthält, so springt sofort die Tatsache in die Augen, dafs sämtliche vertikalen Stäbe, von oben nach unten gelesen, eine beträchtliche Zunahme der Absorptionsquotienten erkennen lassen. So wachsen dieselben z. B. in der dritten Vertikalreihe, welche einer Menge von 100—1000 dargebotenen Agglutinineinheiten entspricht, von 0,17 allmählich im Verlaufe von 5 Injektionen bis auf 0,98 an. Das bedeutet aber nichts andres, als dafs die Affinität der Agglutinine zu den Bakterienleibern im Verlauf der Immunisierung ganz erheblich zugenommen hat. Wie beträchtlich die Affinitätssteigerung ist, geht vielleicht noch deutlicher hervor, wenn man sich vergegenwärtigt, dafs nach der ersten Bakterieneinspritzung von etwa 10 dargebotenen Agglutinineinheiten nur $^1/_3$, also etwa 3 Einheiten, absorbiert wurden, nach der 5. Injektion dagegen von 10000—100000 Einheiten $^9/_{10}$ gebunden würden.

Eine ähnliche, deutlich ausgeprägte Erhöhung der Werte mit der Anzahl der Bakterieninjektionen findet sich auch bei den in Tab. II verzeichneten Quotienten der zweiten Absorption.

Diese eben festgestellte Tatsache, dafs im Verlaufe der Immunisierung eine bedeutende Aviditätssteigerung der produzierten Antikörper eintritt, oder, richtiger ausgedrückt, dafs im Verlaufe der Immunisierung desto avidere Immunkörper gebildet werden, je länger die Vorbehandlung fortgesetzt wird, ist nun, wie leicht einzusehen, von nicht geringer Bedeutung. Denn es geht daraus hervor, dafs zwei Sera oder Serumgemische bei gleichem Gehalt an Antikörpern und unter sonst gleichen Verhält-

nissen dennoch sehr verschiedene Eigenschaften besitzen können, je nach der Dauer der immunisatorischen Behandlung, durch welche sie erzeugt wurden. Hier müssen wir nun einiger Tatsachen gedenken, welche in den letzten Jahren bekannt geworden sind, und zweifellos in aufserordentlich naher Verwandtschaft zu den von uns beobachteten Phänomenen stehen.

Kraus[1]) hat nämlich die interessante Beobachtung gemacht, dafs im Serum von normalen Ziegen und Pferden ein Antitoxin gegen das Gift des Vibrio Naskin enthalten ist, welches das letztere jedoch nicht sofort zu neutralisieren vermag, sondern erst nach längerem Kontakt, während ein durch entsprechende Vorbehandlung mit dem Vibriotoxin erhaltenes Immunserum seine Schutzwirkung momentan entfaltet. Mit Recht hat Kraus hieraus gefolgert, dafs das normale Antitoxin sich in seiner Avidität zu dem Gifte von dem Immunantitoxin unterscheiden mufs, und hat sogar die auffallende Tatsache gefunden, dafs in manchen Fällen bei der Immunisierung nur eine qualitative Änderung des normalen Antitoxins einzutreten scheint — eben die Aviditätssteigerung — während eine vermehrte Produktion desselben nicht zu beobachten war. In anderen Fällen, die sich auf gewisse Antihämolysine bezogen, konnte Kraus allerdings keinen derartigen Unterschied zwischen der Neutralisierungsdauer bei den Normal- und Immunantikörpern finden, so dafs also seine eben erwähnte Beobachtung zunächst vereinzelt dastand.

An der Hand einer ganz anderen Versuchsanordnung haben dann Landsteiner und Reich[2]) Affinitätsunterschiede zwischen den Normalseren und Immunseren nachzuweisen gesucht. Diese Forscher brachten nämlich rote Blutkörperchen einerseits mit normalen, anderseits mit immunisatorisch erzeugten Agglutininen zusammen, isolierten darauf, nach längerer Einwirkung, die Erythrozyten mit Hilfe der Zentrifuge, und digerierten dieselben

1) Zentralbl. f. Bakt., Bd. XXXIV.

2) Zentralbl. f. Bakt., Bd. XXXIX, 1903.

dann durch 15 Minuten bei 45° mit physiologischer Kochsalzlösung. Dabei wurde ein Teil der gebundenen Agglutinine wieder in Freiheit gesetzt, und zwar, wie sich herausstellte, stets bedeutend mehr von den durch Normalserum agglutinierten Blutkörperchen, als von den mit Immunserum beschickten. Die Immunagglutinine hatten somit weit festere, schwerer spaltbare Verbindungen mit den Erythrozyten gebildet als die Normalen, eine Tatsache, die wieder auf eine Steigerung der Aviditäten durch den Immunisierungsprozefs hinweist.

Landsteiner und Reich folgerten aus diesen ihren Beobachtungen, dafs die Ehrlichsche Annahme, nach welcher die bei der Immunisierung neugebildeten Substanzen in naher Beziehung zu den schon im normalen Blutserum vorhandenen Antikörpern stehen, nicht mehr als vollkommen zu Recht bestehend angesehen werden könne, und vermuten, dafs die Abweichungen sich am wahrscheinlichsten dadurch erklären dürften, dafs die Tätigkeit der Zellen, welche die normalen Serumstoffe produzieren, infolge der Immunisierungsreize alteriert werde und somit anders beschaffene Produkte liefere. Vielleicht kämen auch bei der künstlichen Immunisierung andere Gewebsarten in Betracht, als bei der Produktion der normalen Serumstoffe.

Gewifs wird man die Berechtigung dieser Schlufsfolgerungen von Landsteiner und Reich insofern anerkennen müssen, als die zweifellos nachgewiesenen Affinitätsunterschiede zwischen den normalen und immunisatorischen Serumstoffen auch entsprechende Unterschiede in deren chemischem Aufbau notwendig voraussetzen. Da jedoch, wie unsere Untersuchungen gelehrt haben, auch im Verlauf der Immunisierung selbst noch eine kontinuierliche Steigerung der Affinitäten eintritt, also fortwährend etwas anders konstituierte Antikörper produziert werden, so ist klar, dafs dem Affinitätsunterschiede gegenüber den normalen Serumstoffen nicht mehr jene prinzipielle Bedeutung beigelegt werden kann, wie Landsteiner und Reich wollen, und dafs der Ehrlichschen Auffassung

nichts im Wege steht, welche beide Arten von Immunkörpern in innigen genetischen Zusammenhang miteinander bringt. Nur darf man hierbei nicht an der Vorstellung einer absoluten Identität der normalen und der in den verschiedenen Stadien der Immunisierung gebildeten Serumstoffe festhalten, sondern mufs dieselben als Produkt einer und derselben, durch die verschiedensten Einwirkungen modifizierbaren Zellenfunktion auffassen, die durch einseitige Inanspruchnahme eben eine Spezialisierung bzw. qualitative und quantitative Steigerung erfährt.

Im Gegensatz zu den bisher zitierten Arbeiten, welche sich mit den Unterschieden von Normalserum und Immunserum beschäftigen, bringt eine weitere Publikation von Kraufs und Doerr[1]) ein vollkommenes Analogon zu unseren eigenen Befunden, d. h., den Nachweis einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit des Dysenterieantitoxins im Verlaufe der Immunisierung. Es zeigte sich nämlich bei der systematischen Prüfung des Serums von Ziegen, welche mit dem Toxin des Ruhrbazillus behandelt wurden, dafs nicht nur dessen Antitoxingehalt allmählich anstieg, sondern dafs gleichzeitig auch die Geschwindigkeit des Neutralisierungsvorganges zwischen Gift und Gegengift zunahm, indem das Serum nach den ersten Aderlässen nur in vitro entgiftend wirkte, bei gleichzeitiger getrennter intravenöser Injektion dagegen nicht imstande war, Kaninchen vor der Wirkung des Dysenterietoxins zu schützen, während später bei gleichzeitiger Applikation deutliche Schutzwirkung erzielt wurde. Zunächst war aber auch hier ein Heilversuch noch von negativem Erfolge begleitet, und erst nach weiter fortgesetzter Immunisierung stieg die Reaktionsgeschwindigkeit des Antitoxins so sehr an, dafs auch kurative Injektionen noch ein günstiges Resultat ergaben.

Mit Recht machen Kraus und Doerr auf die grofse praktische Wichtigkeit ihres Befundes aufmerksam und stellen die Forderung

1) Wiener klin. Wochenschr., 1905.

auf, dafs bei therapeutisch angewendeten Seren nicht nur deren Antitoxingehalt, sondern auch die Reaktionsgeschwindigkeit im Tierversuche zu prüfen sei, von welcher ja der kurative Effekt wesentlich mit abhängig erscheint.

Hält man nun alle diese Beobachtungen mit unseren eigenen Versuchsergebnissen zusammen, welche auf ganz anderem Wege, mit vollkommen anderer Methodik und an einer ganz anderen Art von Antikörpern gewonnen wurden, so findet man eine vollkommene Übereinstimmung, und man wird daher wohl berechtigt sein, diese Befunde zu verallgemeinern, und als Fazit unserer Untersuchungen die folgenden Sätze aufzustellen:

1. Im Verlauf der Immunisierung findet eine allmähliche Aviditätssteigerung der produzierten Antikörper statt, welche sich, je nach der Natur derselben bzw. nach der Art der Prüfung entweder in einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem betreffenden Antigen äufsert, oder aber in einer vermehrten Bindungs- oder Absorptionskraft für das letztere, wobei demgemäfs die Werte der Absorptionsquotienten sich immer mehr der Einheit nähern.
2. Diese allmähliche Aviditätssteigerung, bzw. die Produktion von Antikörpern mit immer zunehmender Avidität hat zur notwendigen Folge, dafs in dem Serum stets gleichzeitig Substanzen von höchst verschiedenem Affinitätsgrade vorhanden sind (bzw. sein können); nämlich neben älteren, aus der ersten Periode der Immunisierung stammenden und daher noch wenig aviden auch jüngere, mit hoher Avidität begabte Antikörper.
3. Infolgedessen werden bei einem Zusatz von Antigen zu einem solchen Serum zunächst die avidesten Fraktionen der Antikörper gebunden und mit Beschlag belegt werden, während die

weniger aziden im freien Zustand zurückbleiben. Wird dann der Absorptionsversuch unter erneutem Zusatz von Antigen wiederholt, so äufsert sich die geringere Aviditä der zurückgebliebenen Antikörper in einer relativen oder absoluten, oft sehr beträchtlichen Abnahme der Absorptionsquotienten.

Ich möchte mir vorbehalten, den weiteren Verlauf der Antikörperproduktion bei noch länger fortgesetzter Immunisierung mit Rücksicht auf die Aviditätsverhältnisse noch eingehender zu verfolgen. Denn es wäre nicht undenkbar, dafs schliefslich, wenn einmal das Aviditätsmaximum erreicht ist, das der tierische Organismus bei seinen Antikörpern zu erzielen vermag, einheitlichere Aviditätsverhältnisse in dem betreffenden Serum Platz greifen könnten, indem die älteren, noch wenig aviden Substanzen allmählich aus demselben verschwinden, und nur solche von maximaler Avidität in demselben zurückbleiben würden. Allerdings müfste man andererseits wieder mit der von Kraus konstatierten Tatsache rechnen, dafs ebenso wie in vitro, so auch in vivo eine allmähliche Abschwächung der Aviditäten stattfindet, welche wieder geeignet wäre, Affinitätsunterschiede bei den Antikörpern des Serums hervorzurufen.

Ebenso soll auch das Verhalten der Antikörperproduktion bei solchen Versuchstieren, welche hochimmunisiert worden waren, aber infolge einer längeren Pause in der Behandlung keine Immunsubstanzen mehr in ihrem Serum führen, Gegenstand besonderer Untersuchungen sein, indem es von Interesse sein dürfte, zu erfahren, ob in solchem Falle zunächst wieder Antikörper von geringer Avidität gebildet werden, oder ob der Organismus auf eine erneute Einspritzung von Antigen nun sofort mit der Produktion von Substanzen maximaler Avidität reagiert.

# Über die Verwertbarkeit der Komplementablenkungsmethode für die Differenzierung von Mikroorganismen, nebst Bemerkungen über den Zusammenhang dieses Phänomens mit der Agglutinations- bzw. Präzipitationsreaktion.

Von

Privatdozent Dr. **Franz Ballner** und Dr. **Hans Reibmayr**

k. u. k. Regimentsarzt. Assistent des Instituts.

(Aus dem Hygienischen Institute der k. k. Universität in Innsbruck. Vorstand: Prof. A. Lode.)

## A. Literaturübersicht.

Das Bordet-Gengousche Phänomen der Komplementablenkung hat in der letzten Zeit das Interesse der bakteriologischen Forscher in hohem Maſse in Anspruch genommen. Man benutzte diese scheinbar so feine biologische Reaktion einerseits zur Erkennung von spezifischen Bakterienstoffen und ihren Reaktionsprodukten im Tierkörper, anderseits zur Differenzierung von Eiweiſskörpern überhaupt, wodurch der forensischen Medizin für den Nachweis spezifischer Blutarten, der vergleichenden Zoologie für die Aufklärung der natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse der Tierspezies ein dankbares Feld sich zu eröffnen scheint.

Wassermann und seine Mitarbeiter haben das Verfahren der Komplementbindung speziell für klinische Zwecke als diagnostischen Behelf empfohlen, wobei sie behaupten, daſs auch Erkrankungen, bei denen man den Erreger bisher nicht kultivieren konnte, der Serodiagnostik zugänglich geworden sein sollen [1,2,3,4].

1) Wassermann u. Bruck, med. Klinik 1905, Nr. 55.

2) Wassermann, Neisser u. Bruck, Deutsche med. Wochenschrift 1906, Nr. 19, S. 745.

3) Neisser, Bruck u. Schucht, Deutsche med. Wochenschrift 1906, Nr. 48, S. 1937.

4) Wassermann, Neisser, Bruck u. Schucht, Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 55, S. 451.

Namentlich soll es nach diesem Verfahren gelungen sein, im Serum von mit syphilitischem Material vorbehandelten Affen spezifische Antikörper gegen luetische Substanzen und sodann mit Hilfe dieser Immunsera in syphilitischen Produkten spezifische Luesstoffe nachzuweisen. Diese positiven Befunde wurden in neuerer Zeit auch von Marie und Levaditi [1]) bestätigt.

In weiterer Verfolgung der Untersuchungen über die Seradiagnostik der Lues haben Wassermann und Plaut [2]) auf das Vorhandensein von syphilitischen und antisyphilitischen Stoffen in der Zerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern aufmerksam gemacht und hierdurch durch eine biologische Reaktion den direkten kausalen Zusammenhang zwischen Paralyse und Lues wahrscheinlich gemacht. Über ähnliche Befunde berichten auch Morgenroth und Stertz [3]), während Schütze [4]) nach der gleichen Versuchsmethodik in der Lumbalflüssigkeit von Tabikern syphilitische Antistoffe auffinden konnte.

Unsere Versuche hatten zunächst die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung für die Differenzierung der Kapselbazillen, ferner der Vertreter der Typhus- und Choleragruppe zum Gegenstande. Weiters interessierte uns die Frage, ob sich zwischen Komplementablenkung und Agglutinationsreaktion Beziehungen nachweisen lassen.

Aus der Fülle der Literatur über Komplementablenkung heben wir nur die wichtigsten Daten über Differentialdiagnose von Mikrobien mittels dieses Verfahrens hervor.

So war Dopter [5]) bestrebt, mit Hilfe dieser Reaktion biologische Differenzen zwischen den verschiedenen Dysenteriestämmen herauszufinden. Die Resultate seiner Untersuchungen lassen sich dahin zusammenfassen, dafs die sowohl in dem Serum von Tieren, die mit Dysenteriebazillen immunisiert wurden, als auch in Krankenseris vorhandene »substance sen-

1) Marie u. Levaditi, Annales de l'Institut Pasteur 1907, Bd. 21, Nr. 2.
2) Wassermann u. Plaut, Deutsche med. Wochenschr. 1906, S. 1769.
3) Morgenroth u. Stertz, Virch. Arch., Bd. CLXXXVIII 1907, Nr 1.
4) Schütze, Berliner klinische Wochenschrift 1907, S. 126.
5) Dopter, Annales de l'Institut Pasteur Nr. 12, 1905, S. 753.

sibilisatrice« in derselben Höhe sowohl für den Shiga- wie für den Flexnertypus spezifisch ist, weshalb Dopter im Gegensatz zu vielen deutschen Autoren der Ansicht zuneigt, dafs die verschiedenen Dysenteriestämme Rassen eines und desselben spezifischen Keimes darstellen. Rieux et Sacquépée [1]) prüften die Wirkung von Typhus- und Paratyphusimmunseris mit den entsprechenden Mikrobienstämmen auf Bindung des Komplementes und fanden die Sensibilisatoren des Typhusbazillus strenger spezifisch als die des Paratyphus und die des Paratyphus A wieder mehr spezifisch als die des Typhus B. Schwache Paratyphussera sind strenger spezifisch als die starken, denn hochwertige Sera zeigen häufig »Nebensensibilisatrices«. Aus diesen Resultaten ergibt sich, dafs sich durch das Verfahren der Komplementablenkung deutliche Unterschiede zwischen Typhus- und Paratyphusbazillen herausfinden lassen.

Die Methode der Komplementablenkung wurde in weiterer Folge auch dazu verwendet, um die Beziehungen zu studieren, die zwischen den verschiedenen säurefesten Bazillen existieren. Bordet und Gengou [2]) zeigten im Jahre 1903, dafs man durch die Behandlung von Meerschweinchen mit dem Bazillus der Vogeltuberkulose eine sensibilisierende Substanz erzeugen könne, deren Wirksamkeit sich ebenso auf die Bazillen der menschlichen Tuberkulose wie auf die der Vogeltuberkulose erstreckt, so dafs es auf diesem Wege nicht gelingt, diese beiden Rassen voneinander zu unterscheiden. In Ergänzung dieser Versuche teilt Gengou [3]) in einer späteren Abhandlung mit, dafs sich bei der Behandlung von Meerschweinchen mit säurefesten Bazillen der verschiedensten Art — saprophytischen und für Kalt- und Warmblütler pathogenen — Antikörper bilden, die nicht allein gegen die homologen Mikrobien aktiv sind, sondern auch noch gegen andere säurefeste Bazillen, ins-

1) Rieux et Sacquépee, Société de Biologie 1905, p. 532, zit. nach Fol. haematologica 1906, S. 273.

2) Bordet et Gengou, Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris 1903, zit. nach hygien. Rundschau 1905, S. 252.

3) Gengou, Berliner klinische Wochenschrift Nr. 48, 1906, S. 1531.

besondere gegen die Menschen-, Rinder- und Hühnertuberkulosebazillen.

Weitere Differenzierungsversuche mit Hilfe des Phänomens der Komplementablenkung wurden unternommen von Bertarelli[1]) für die Gruppe der Kapselbazillen, von Markl[2]) und Schütze[3]) für die Differenzierung der echten Cholera von choleraähnlichen Vibrionen, sowie von Leuchs[4]) zur Unterscheidung des Typhus von Paratyphus. Auf die Resultate dieser letztgenannten Autoren wird erst an den betreffenden Stellen unserer eigenen Untersuchungen näher eingegangen werden. Hier sollen der Vollständigkeit halber noch die Versuche erwähnt werden, die eine Differenzierung verschiedener Kokkenarten durch das Komplementbindungsverfahren zu erreichen beabsichtigten. Nach Vannod[5]) erwies sich bei Gonokokken- und Meningokokkenseris dieses Verfahren für diagnostische Zwecke der Agglutination anscheinend überlegen, weil im Gonokokkenserum, welches Meningokokken agglutinierte, keine Sensibilisatoren für die Kokken von Weichselbaum-Jäger und umgekehrt im Meningokokkenserum keine Antikörper für die Gonokokken vorhanden waren. Eysbroek[6]) dagegen beobachtete, dafs alle Streptokokken, gleichgültig von welcher Herkunft, mit Antistreptokokkenserum gemischt, eine bedeutende Komplementbindung zeigten. Die im Antistreptokokkenserum anwesenden Sensibilisatoren waren also nicht nur für die zur Immunisierung verwendete Streptokokkenart spezifisch, sondern sie zeigten sich auch für andere Arten wirksam. Eysbroek zog aus diesen Ergebnissen den verallgemeinernden Schlufs, dafs man mittels der Methode nach Bordet et Gengou nicht imstande sei, nahe verwandte Mikroorganismen, welche

1) Bertarelli, Zentralblatt für Bakteriologie, Ref. Bd. 37, S. 338.
2) Markl, Zentralblatt für Bakteriologie, Orig. Bd. 42, S. 380.
3) Schütze, Berliner klinische Wochenschrift Nr. 26, 1907, S. 800.
4) Leuchs, Berliner klinische Wochenschrift Nr. 3 u. 4, 1907.
5) Vannod, Deutsche med. Wochenschrift Nr. 49, 1906, S. 1984.
6) Eysbroek, Verslagen van de konniklike Akademie van Wetenschoppen te Amsterdam 1906, zit. nach Fol. haematolog. 4. Jahrg. 1907, Nr. 3, S. 408.

man auf anderm Wege schwer differenzieren kann, voneinander zu trennen. Auch eine Differenzierung verschiedener Hefearten, welche durch die Präzipitinreaktion nicht voneinander unterschieden werden konnten, ist Schütze [1]) durch das Verfahren der Komplementfixation nicht gelungen.

Ein besonderes Interesse verdienen noch die Versuche von Westenhöffer [2]), der das Verfahren der Komplementbindung dazu benutzte, um festzustellen, ob auf biologischem Wege eine Beziehung des Carcinoms zur Urzelle nachweisbar sei. Nach Schütze, der die entsprechenden Versuche durchführte, ergab aber die Reaktion keine Anhaltspunkte über die Entstehungsursache des Carcinoms. Dagegen soll es nach Bruck [3]) mit dieser Methode gelingen, die einzelnen Affenarten nach ihrer Stellung im System und ihrem Verhältnis zum Menschen biologisch zu differenzieren, ferner Angehörige der mongolischen und malayischen Rasse biologisch voneinander zu unterscheiden.

### B. Differenzierungsversuche in der Gruppe der Kapselbazillen.[4])

Die Kapselbazillen bilden eine Gruppe von Mikroorganismen, bei welchen trotz der Verfeinerung unserer bakteriologischen Technik die Versuche zur Trennung der einzelnen Arten sowohl untereinander wie auch gegenüber anderen Bakteriengruppen nicht von demselben günstigen Erfolge begleitet waren, als bei anderen wichtigeren pathogenen Mikroorganismenarten (Vibrionen, Typhusgruppe usw.). Man war ursprünglich bestrebt, die einzelnen Arten, namentlich mit Rücksicht auf die ihnen zukommende ätiologische Rolle, zu trennen, oder sie auf Grund von geringfügigen morphologischen und biologischen Unterschieden als verschiedene Spezies zu sondern. Ein anderer Teil der Untersucher wiederum vertrat die Ansicht, dafs die Kapsel-

1) Schütze, a. a. O.

2) Westenhöffer, Berliner klin. Wochenschr., Nr. 19, 1907, S. 593.

3) Bruck, dieselbe Zeitschrift Nr. 26, 1907, S. 793.

4) Ein Teil der einschlägigen Untersuchungen wurde bereits in einer früher erschienenen Abhandlung mitgeteilt. (Ballner und Reibmayr, Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 13.)

bazillen untereinander überhaupt nicht artverschieden seien, sondern nur Varietäten einer und derselben Spezies darstellen.

Da die gewöhnlichen differential-diagnostischen Momente wie kulturelles Verhalten, Tierpathogenität, chemisch-biologische Eigenschaften keine verläfslichen Unterscheidungsmerkmale abgegeben hatten, erwartete man sich bessere Erfolge von der Erforschung der Immunitätsreaktionen, insbesondere der Agglutinationsreaktion. Doch die Bemühungen von Fasching, Pfeiffer, Löwenberg, Abel, Wilde, Landsteiner und einer Reihe anderer Forscher, die sich mit dem Studium der Antikörper des Serums der mit Kapselbazillen immunisierten Tiere befafsten, zeitigten wenig ermutigende Resultate.

In grofsem Mafsstabe versuchte Clairmont[1]) mit Hilfe der Seradiagnostik eine Differenzierung der einzelnen Arten der Kapselbazillen herbeizuführen, aber auch bei diesen äufserst sorgfältigen und umfassenden Untersuchungen konnte weder durch die Agglutination noch durch die Bestimmung der Schutzwirkung des Immunserums das angestrebte Ziel erreicht werden.

Auch Bertarelli[2]) hat sehr eingehende Prüfungen zur Erzielung einer Systematik der Kapselbazillen auf Grund der Immunitätsreaktionen vorgenommen. Wenn auch, wie sich dabei herausstellte, die Agglutinationsfähigkeit eines Serums gewöhnlich gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Stamm stärker zutage trat, so wurden doch auch andere Stämme von den geprüften Seris mehr oder weniger beeinflufst. Der genannte Autor konnte aufserdem die Wahrnehmung machen, dafs sich in den durch Immunisierung mit Kapselbazillen gewonnenen Seris nach dem Verfahren von Bordet und Gengou Antikörper vorfinden, und dafs diese Sensibilisatoren zwar für den zur Immunisierung verwendeten Stamm zahlreicher sind, dafs sie aber auch mehreren Keimen gemeinsam sind.

Dafs Antikörper bei der Immunisierung mit Kapselbazillen gebildet werden, steht wohl nach den Berichten über positive

1) Clairmont, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, 1902, Bd. 39, S. 1; dortselbst auch ausführlicher Literatur über die Differenzierungsversuche bei Kapselbazillen.

2) Bertarelli, Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. 37, Ref. 1906, S. 338.

Agglutinationsversuche aufser Zweifel. Die Ursache aber, warum sich diese Antikörper in den meisten Fällen dem Nachweise durch die Agglutinationsreaktion entziehen, liegt ausschliefslich in der Inagglutinabilität der Bakterienstämme als solchen. Daher bedeutet in dieser Frage die Arbeit von Porges[1]) einen Schritt nach vorwärts, der auf Grund der Erwägung, dafs bei den schwer agglutinablen Kapselbazillen die Schleimhüllen für dieses Verhalten verantwortlich zu machen seien, durch Entfernung der Schleimhüllen die Agglutinabilität zu erhöhen suchte. Nach der Methode von Porges hat nun Streit[2]) versucht, diagnostische Unterscheidungsmerkmale zwischen Sklerom- und Friedländerbazillen herauszufinden. Bei der Durchführung aber ergaben sich insofern Schwierigkeiten, als auch die Methode von Porges durchaus nicht auf alle Stämme so gleichmäfsig einwirkte, wie es für die Zwecke einer differential-diagnostischen Untersuchung erforderlich gewesen wäre.

Demgegenüber aber berichten v. Eisler und Porges[3]) über die Möglichkeit einer Differenzierung von Kapselbazillen mit Hilfe agglutinierender und präzipitierender Sera, indem sich nach Beseitigung der Inagglutinabilität der Mikroorganismen Rhinosklerom- und Friedländerbazillen auf Grund der spezifischen Agglutinationsreaktion deutlich voneinander scheiden liefsen. Auch die Präzipitationsreaktion ergab eine deutliche Verschiedenheit von Bacillus Friedländer, Bacillus rhinoscleromatis und Bacillus ozaenae. Diese letztgenannten Angaben sind eigentlich die einzigen, die sich für die Möglichkeit einer Differenzierung der Kapselbazillen aussprechen.

Da vereinzelte Angaben über positive Ergebnisse nach der Bordet-Gengouschen Methode bei inagglutinablen Mikrobienarten vorlagen (Diphtherie, Anthrax), lag es nahe, dieselbe auch für die Differentialdiagnose der Kapselbazillen zu verwenden.

Die Versuche Bertarellis waren uns ursprünglich noch nicht bekannt und überdies lag es in unserem Plane, als

1) Porges, Wiener klinische Wochenschrift, 1905, Nr. 26.
2) Streit, Zentralbl. f. Bakteriologie, 1906, Orig.-Bd. 40, S. 709.
3) v. Eisler u. Porges, Zentralbl. f. Bakter., 1906, Orig.-Bd. 42, Heft 7.

Antigen nicht Vollbakterien zu verwenden, sondern die von Wassermann empfohlenen Bakterienextrakte.

Unserer Versuchstechnik schlofs sich im allgemeinen an die von Wassermann und seinen Mitarbeitern geübte Methodik an; nichtsdestoweniger aber dürfte es notwendig sein, die Vorbereitungen zu unseren Versuchen, die sich namentlichauf die Gewinnung der Immunsera und der Bakterienextrakte beziehen, einer kurzen Besprechung zu unterziehen.

Die für die Untersuchung bestimmten Mikrobienstämme entnahmen wir der Sammlung des Institutes und zwar standen uns hierzu folgende Stämme zur Verfügung:

I. 3 Stämme von Bacillus pneumoniae Friedländer (*, Wien, München),

II. 2 Stämme von Bacillus rhinoskleromatis (Ghon, Paltauf),

III. 1 Stamm von Bacillus mucosus,

IV. 1 Stamm eines Nasenborkenbazillus.

Die Immunsera lieferten Kaninchen, die durch wiederholte Injektionen von abgetöteten Kulturen von Kapselbazillen vorbehandelt wurden. Die Einverleibung der Antigene erfolgte intravenös und zwar wurden in Zwischenräumen von ca. zehn Tagen je 2—3 ccm einer 24stündigen Agarkultur, aufgeschwemmt in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung, injiziert. Die Aufschwemmungen wurden behufs Abtötung durch 1 Stunde im Wasserbade auf 60° C erwärmt. Die Tiere, deren Sera zur Auswertung gelangten, erhielten im ganzen 3 Injektionen.

Für die Herstellung von wirksamen Bakterienextrakten mufste für die Gruppe der Kapselbazillen ein etwas umständlicherer Weg eingeschlagen werden, da die Möglichkeit nicht auszuschliefsen war, dafs die Schleimhüllen der Bakterien ebenso wie für die Agglutination auch für die Abgabe von löslichen Bakteriensubstanzen ein Hindernis abgeben. Daher wollten wir uns nicht allein auf die Verwendung von Extrakten aus abgetöteten Kulturaufschwemmungen beschränken, sondern wir bereiteten uns auch Extrakte aus solchen Bakterien, bei welchen nach der Methode von Porges durch Hydrolyse des Proteins eine Auflösung der Schleimhüllen stattgefunden hatte. Um zu-

erfahren, auf welche Weise sich ein wirksamer Extrakt von Kapselbazillen erzielen lasse, gelangten in einem Vorversuche folgende Extrakte zur Verwendung:

1. 24stündige Agarkulturen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 1 Stunde auf 60° C im Wasserbade erwärmt, hierauf mehrere Tage bei 37° C stehen gelassen, nach dieser Zeit durch 6 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und nachher mit der elektrischen Zentrifuge klar zentrifugiert.
2. 24stündige Agarkulturen, aufgeschwemmt in physiologischer Kochsalzlösung, wurden mit $^1/_4$ n HCl bei 80° C angesäuert, nachher neutralisiert und wie sub 1 weiter behandelt.
3. 24stündige Agarkulturen wurden wie sub 2 zur Entfernung der Kapseln behandelt; nach der Behandlung wurde sofort zentrifugiert und die über dem Bodensatze stehende Flüssigkeit als Extrakt in Verwendung genommen.
4. Der nach der Behandlung sub 3 restierende Bodensatz wurde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung bis zur ursprünglichen Menge der Aufschwemmung ausgefüllt und wie sub 1 weiter behandelt.

Wurden nun diese vier, auf verschiedene Art gewonnenen Extrakte mit Immunseris zusammengebracht, so ergaben sich die folgenden Resultate, die in Tabelle I verzeichnet sind. Die Methodik bei diesen, wie auch den übrigen Versuchen bestand darin, dafs abgestufte Mengen des Immunserums mit je 1 ccm des an und für sich nicht mehr hemmenden Extraktes versetzt wurden; dazu kam als Komplement normales, frisches Meerschweinchenserum, und zwar zumeist 1 ccm der Verdünnung 1 : 20. Die Röhrchen kamen nach dem Eintragen der Serumverdünnungen, des Extraktes und des Komplementes durch eine Stunde in den Brutschrank bei 37° C, worauf der Zusatz des hämolytischen Systems erfolgte. Als letzteres wurden wiederholt gewaschene Rinderblutkörperchen und das inaktivierte Serum von Kaninchen benutzt, die mehrmals subkutane Injektionen von gewaschenen Rinderblutkörperchen erhalten

hatten. Die Proben blieben hierauf 2 Stunden bei 37° C, wurden sodann in einen kalten Raum gestellt und die Resultate nach 20 Stunden registriert.

Die Immunsera wurden zu den Versuchen stets am Vortage entnommen, nach 15stündigem Stehen klar zentrifugiert, 1 Stunde auf 56° C erwärmt und hierauf sofort zum Anlegen der Verdünnungen verwendet.

Tabelle I.

Bestimmung des Hemmungstiters bei Einwirkung der auf verschiedene Art bereiteten Extrakte von Kapselbazillen auf ein Friedländer (*) und Rhinosklerom-Immunserum.

A. Friedländer (*) Immunserum + Extrakt von Bac. pneumon. Friedländer (*).
Serumverdünnungen: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500.

| Friedländer * Serum + Extrakt aus abgetöteten u. geschüttelten Kulturen (1) | Friedländer * Serum + Extrakt von Bac pneum. Friedländer, nach Behandlung nach Porges (2) | Friedländer * Serum + Extr. von Friedländer-Baz. (überstehende Flüssigkeit nach Behandlung n. Porges (3) | Friedländer *-Serum + ausgelaugten Restbakterien nach der Behandlung nach Porges (4) |
|---|---|---|---|
| Bis zur Verdünnung 1 : 500 eine deutlich wahrnehmbare Hemmung. | Von Verdünnung 1 : 200 an komplette Lyse. | Von Verdünnung 1 : 10 bis 1 : 500 komplette Lyse. | Von Verdünnung 1 : 10 bis 1 : 500 komplette Lyse. |

B. Rhinosklerom-Immunserum + Extrakte von Rhinosklerombazillen.
Serumverdünnungen: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500.

| Rhinosklerom-serum + Extrakt aus abgetöteten u. geschüttelten Rhinosklerom-kulturen (1) | Rhinosklerom-serum + Extrakt von Rhinosklerom-bazillen, behandelt nach Porges (2) | Rhinosklerom-serum + Extrakt von Rhinosklerom-baz. (überstehende Flüssigkeit nach Behandlung nach Porges) (3) | Rhinosklerom-serum + ausgelaugten Restbakterien nach Behandlung nach Porges (4) |
|---|---|---|---|
| Bis zur Verdünnung 1 : 200 deutliche Hemmung | Bis 1 : 100 deutliche Hemmung; von 1 : 200 bis 1 : 500 komplette Lyse | 1 : 10 leichte Hemmung; in den übrigen Verdünnungen Lyse | Von 1 : 10 bis 1 : 500 komplette Lyse |

Aus dieser Tabelle geht unzweideutig hervor, dafs der kräftigste Ablenkungstiter mit den aus abgetöteten und geschüttelten Kulturen erhaltenen Extrakten erreicht wird, während die Ablenkung mit den nach den drei anderen Arten gewonnenen Extrakten entweder gar nicht vorhanden ist oder doch weit hinter dem erstgenannten Titer zurückbleibt. Für die weiteren Versuche wurden daher immer nur die aus abgetöteten Bakterien bereiteten Extrakte verwendet.

Um alle Fehlerquellen bei der Anstellung der Reaktion auszuschliefsen, mufste auf die Tatsache besondere Rücksicht genommen werden, dafs die Extrakte allein schon imstande sind, Komplement zu adsorbieren. Denn es ist schon seit längerer Zeit, namentlich durch die Untersuchungen von v. Dungern, Ehrlich und Sachs, Landsteiner und Stankovié und anderen[1]) bekannt, dafs eiweifshaltige Flüssigkeiten, z. B. Zellenextrakte, durch Komplementadsorption eine Hemmung der Hämolyse bewirken. Uhlenhut[2]) macht besonders darauf aufmerksam, dafs die praktische Verwertbarkeit der Neifser-Sachsschen Reaktion für die forensische Blutdifferenzierung durch das Komplementablenkungsverfahren deshalb auf Schwierigkeiten stöfst, weil eine Reihe von Stoffen, wie Schweifs, Haare, Urin, Tuberkulin usw. an sich schon eine Ablenkung hervorrufen. Wenn auch solche Verhältnisse für die Seradiagnose von Bakterien, wobei nur mit reinem Material gearbeitet wird, nicht in Betracht kommen, so ist die Kenntnis dieser Tatsachen doch wichtig, weil damit ein Fingerzeig gegeben wird, wie leicht Irrtümer in der Deutung der Reaktion unterlaufen können.

Die Adsorption des Komplementes durch Tuberkulin veranlafste Weil und Nakajama[3]) zu dem Urteile, dafs Wassermann und Bruck durch ihre Versuchsanordnung nicht Antituberkulin nachgewiesen haben, dafs es sich also bei ihren

1) Die einschlägige Literatur siehe Landsteiner und Stanković, Zentralbl. für Bakteriologie, Bd. 42, Orig., 1906, S. 353.

2) Uhlenhut, Deutsche med. Wochenschrift, 1906, S. 1244.

3) Weil und Nakayama, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 21.

Versuchen nicht um einen spezifischen Bindungsvorgang gehandelt hat, sondern dafs sich unterhemmende Dosen von Tuberkulin mit unterhemmenden Dosen von tuberkulösen Organextrakten zu hemmenden summiert haben. An anderer Stelle hat aber Wassermann mit seinen Mitarbeitern [1]) die Unhaltbarkeit dieser Deutung in eigens darauf gerichteten Versuchen darzutun versucht.

Die Fähigkeit der Komplementbindung nun kommt den Bakterienextrakten in hohem Grade zu und Axamit [2]) hat gezeigt, dafs von verschiedenen Bakterienextrakten der Extrakt von Choleravibrionen am stärksten hemmt, hierauf folgt der Extrakt von Blastomyzeten und schliefslich der Staphylokokkenextrakt.

Aus allen diesen Angaben ergibt sich die Notwendigkeit, vor jedem Versuche sowohl die Extrakte wie auch die Sera und zwar jedes für sich allein auf komplementablenkende Fähigkeit zu prüfen. Ja nach Wassermann sind die zur Verwendung gelangenden Reagentien dann unbrauchbar, wenn in den Flüssigkeiten sich die geringsten Mengen von Eiweifsniederschlägen bilden. Für die Versuchstechnik folgt daraus, dafs vor jedem Versuche alle Flüssigkeiten auf Klarheit zu prüfen sind, und dafs dann, wenn sich die geringsten Trübungen vorfinden, ein nochmaliges Zentrifugieren erforderlich ist.

Der Titer der Extrakte kann sich aber, wie wir uns mehrmals überzeugen konnten, sogar von einem Tag bis zum andern ändern, woraus sich wiederum die Notwendigkeit ergibt, für vergleichende Bestimmungen alle Untersuchungen möglichst an einem Tage vorzunehmen.

Bei allen unseren differential-diagnostischen Bestimmungen nahmen wir auf diese Verhältnisse Rücksicht und verwendeten einerseits nur frische und vollständig klar zentrifugierte Sera,

1) Wassermann, Neifser, Bruck und Schucht, Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 1906, Bd. 55, S. 451.

2) Axamit, Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. 42, Orig. 1906, Heft 4, S. 349 u. 450.

anderseits immer die gleichen Bakterienextrakte, die stets unmittelbar vor jedem Versuche auf Eigenhemmung austitriert wurden. Von den Bakterienextrakten konnte nur eine solche Konzentration zur Verwendung gelangen, welche für sich allein die komplette Lösung des hämolytischen Systems in keiner Weise störte.

In erster Linie suchten wir die Frage zu lösen, ob durch das Komplementbindungsverfahren eine Abgrenzung der einzelnen Arten der Kapselbazillen in der Gruppe selbst erzielt werden könne. Zu diesem Behufe wurden, wie aus den folgenden Tabellen zu ersehen ist, die Immunsera mit den homologen Formen mit verschiedenen heterologen Extrakten von Kapselbazillen vermischt und die Ablenkungstiter festgestellt.

Tabelle II.

Bestimmung des Hemmungstiters bei Einwirkung von Extrakten von Kapselbazillen auf ein Friedländer-Immunserum.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 |
| Friedländer (*) - Immunserum | Friedländer- (*) Bazillen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | grofse Kuppe | f. kompl. Lyse |
| | Friedländer- (Wien) Bazillen | › | › | › | grofse Kuppe | › | kleine Kuppe |
| | Friedländer- (München) Bazillen | › | › | › | Hemmung | Hemmung | grofse Kuppe |
| | Rhinosklerom- (Paltauf) Bazillen | › | › | › | Kuppe | kleine Kuppe | kompl. |
| | Rhinosklerom- (Ghon) Bazillen | › | › | › | grofse Kuppe | › | kleine Kuppe |
| | Nasenborkenbazillus | › | › | › | Hemmung | Hemmung | f. komplett |
| | Bacillus mucosus | › | › | grofse Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | › |

Der höchste Ablenkungstiter wird erhalten beim Versetzen dieses Immunserums mit Extrakten von Bacillus Friedländer-München und dem Nasenborkenbazillus (Serumtiter 1 : 200);

die Extrakte der beiden Rhinoskleromstämme bewirken noch mit der Serumverdünnung 1 : 50 absolute Hemmung der Hämolyse und der Extrakt von Bacillus mucosus erzeugt die geringste Ablenkung (1 : 20). Es verdient ferner noch hervorgehoben zu werden, dafs die Extrakte der drei verschiedenen Friedländerstämme sich in bezug auf hemmende Wirkung nicht vollkommen gleichmäfsig verhielten.

Tabelle III.

Bestimmung des Hemmungstiters bei Einwirkung von Extrakten von Kapselbazillen auf ein Rhinosklerom-Immunserum.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 |
| Rhinosklerom- (Paltauf) Immunserum | Rhinosklerom- (Paltauf) Bazillen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Kuppe | komplett |
| | Rhinosklerom- (Ghon) Bazillen | » | » | » | grofse Kuppe | » | kleine Kuppe |
| | Friedländer- (*) Bazillen | » | » | » | Kuppe | fast komplett | komplett |
| | Friedländer- (Wien) Bazillen | » | » | grofse Kuppe | » | » | fast kompl. |
| | Friedländer- (München) Bazillen | » | » | Hemmung | grofse Kuppe | grofse Kuppe | Kuppe |
| | Bacillus mucosus | » | » | » | » | Kuppe | fast kompl. |
| | Nasenborken-Bazillen | » | » | » | » | » | » |

In diesem Falle wird der höchste Ablenkungstiter erreicht beim Zusammenbringen des Immunserums mit dem homologen Bakterienextrakt (Rhinosklerom Paltauf) und zwar bei der Serumverdünnung 1 : 100. Doch fast sämtliche übrigen Extrakte, ausgenommen der Extrakt von Bacillus Friedländer (Wien), hemmen auch noch in der Verdünnung des Serums 1 : 50, d. i. der gleichen Verdünnung, bis zu welcher die Hemmung durch den homologen Stamm Rhinosklerom (Ghon) erfolgt.

Tabelle IV.

**Bestimmung des Hemmungstiters bei Einwirkung von Extrakten von Kapselbazillen auf ein Immunserum von Bacillus mucosus.**

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bacillus mucosus Immunserum | Bazillus mucosus | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | grofse Kuppe | f. komplett |
| | Friedländer (*) Bazillen | » | » | grofse Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | komplett |
| | Friedländer- (Wien) Bazillen | » | » | » | grofse Kuppe | Kuppe | f. komplett |
| | Friedländer- (München) Bazillen | » | » | » | » | kleine Kuppe | » |
| | Rhinosklerom- (Paltauf) Bazillen | » | » | » | » | Kuppe | » |
| | Rhinosklerom- (Ghon) Bazillen | » | » | Hemmung | » | kleine Kuppe | » |
| | Nasenborkenbazillen | » | » | grofse Kuppe | » | » | » |

Die stärkste Ablenkung zeigt das Bacillus mucosus-Immunserum im Verein mit dem homologen Extrakt (Titer 1 : 100), mit dem Extrakte von Rhinosklerom (Ghon)-Bazillen stellt sich der Ablenkungstiter auf 1 : 50, während beim Zusammenbringen dieses Immunserums mit den übrigen Extrakten von Kapselbazillen bei 1 : 20 eine vollständige Hemmung zu konstatieren ist.

Die angeführten Versuchsprotokolle berechtigen zu dem Schlusse, dafs tatsächlich beim Zusammenbringen von Extrakten von Kapselbazillen mit Immunseris derselben eine Bindung des zugesetzten Komplementes und zwar auch in höheren Verdünnungen des Immunserums stattfindet. Es können also, wie schon Bertarelli angegeben hat, durch das Phänomen der Komplementablenkung Antikörper für die Kapselbazillen in dem Serum der immunisierten Tiere nachgewiesen werden. Diese Behauptung wird aufserdem noch dadurch gestützt, dafs die Normalsera der zur Immunisierung verwendeten Tiere eine Kom-

plementbindung nur in hohen Serumkonzentrationen erkennen liefsen. Der Hemmungstiter der normalen Kaninchensera vor der Immunisierung mit den Extrakten der zur Immunisierung verwendeten Bakterien war nicht höher als 1 : 10.

Die Frage aber, ob sich auf Grund dieses Antikörpernachweises eine Differenzierung der Vertreter der Gruppe der Kapselbazillen in der Gruppe selbst erzielen läfst, kann nach unseren Versuchsresultaten nicht in bejahendem Sinne beantwortet werden. Die Unterschiede in der Bindung des Komplementes seitens der Immunsera mit den homologen und den heterologen Extrakten von Kapselbazillen sind so geringe, dafs wir nach den unter unseren Versuchsbedingungen erhaltenen Resultaten die Möglichkeit einer Differenzierung in Abrede stellen müssen. Wir wollen es einstweilen dahingestellt sein lassen, ob die Ursache hierfür in der Unzulänglichkeit der Methode zu suchen sei, oder in der Eigentümlichkeit der Bakteriengruppe, oder endlich in der nahen Verwandtschaft bzw. Identität der einzelnen von den Autoren als eigene Spezies beschriebenen Mikrobienformen.

Wir befinden uns in diesem Punkte in vollständiger Übereinstimmung mit Bertarelli, der gleichfalls die Wahrnehmung machte, dafs zwar die Sensibilisatoren für den zur Immunisierung verwendeten Keim zahlreicher sind, doch ist die Wirkung keine streng spezifische, indem sich in den verschiedenen Immunseris überdies deutlich nachweisbare Sensibilisatoren für die übrigen Stämme vorfinden.

Aber auch für die Abgrenzung der Vertreter der Kapselbazillen gegenüber anderen Bakteriengruppen gibt die Methode der Komplementfixation nicht genügend verläfsliche Ausschläge. Den Beweis hierfür erbrachten wir dadurch, dafs wir einerseits verschiedene Extrakte von heterologen, aufserhalb der Gruppe der Kapselbazillen stehenden Bakterienarten mit einem Friedländer-Immunserum zusammenbrachten, anderseits den Ablenkungstiter bei Einwirkung von Extrakt von Friedländerbazillen auf Normalserum und mehrere heterologe Immunsera prüften.

Die Resultate dieser Prüfungen sind aus den zwei vorstehenden Tabellen ersichtlich; Tabelle VI enthält aufserdem noch die notwendigen Kontrollversuche.

Tabelle V.

**Bestimmung des Hemmungstiters bei Einwirkung verschiedener heterologer Bakterienextrakte auf ein Friedländer-Immunserum.**

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 |
|---|---|---|---|---|---|
| Friedländer-Immunserum | Milzbrand-bazillen | Hemmung | Hemmung | kl. Kuppe | kl. Kuppe |
| » | Cholera-vibrionen | » | » | » » | » » |
| » | Typhus-bazillen | » | gr. Kuppe | » » | » » |
| » | Kolibazillen | » | Hemmung | » » | » » |

Tabelle VI.

**Bestimmung des Hemmungstiters bei Einwirkung von Extrakt von Friedländerbazillen auf Normalserum und verschiedene heterologe Immunsera.**

| | Art des Serums | Extrakt von | Physiolog. Kochsalzlösung ccm | Komplem. (Meerschw.-Serum 1:20) ccm | Ambozept (Kaninchen-ser. 1:200) ccm | 5% Rinder-blutaufschwemm. ccm | Resultat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Normal. Kaninchenserum (1 ccm d. Verdünn. 1 : 10) | Friedl.-Bazill. | — | 1 | 1 | 1 | Lyse |
| | Staphylokokken - Immunserum (1 ccm d. Verdünn. 1 : 10, 1 : 20 u. 1 : 50) | » | — | 1 | 1 | 1 | bei 1 : 10 Hemmung<br>» 1 : 20 »<br>» 1 : 50 beginn. Lyse |
| | Anthrax-Immunserum (1 ccm d. Verdünn. 1 : 10, 1 : 20 u. 1 : 50) | » | — | 1 | 1 | 1 | bei 1 : 10 gr. Kuppe<br>» 1 : 20 Kuppe<br>» 1 : 50 » |
| | Typhusimmunserum (1 ccm d. Verdünn. 1 : 10, 1 : 20 u. 1 : 50) | » | — | 1 | 1 | 1 | bei 1 : 10 Hemmung<br>» 1 : 20 u. 1 : 50 beginnende Lyse |
| Kontrollen | Friedländerserum (1 ccm d. Verd. 1 : 20) | — | 1 | 1 | 1 | 1 | kompl. Lyse |
| Kontrollen | — | 1 ccm | 1 | 1 | 1 | 1 | » » |
| Kontrollen | — | — | 3 | 1 | — | 1 | keine » |
| Kontrollen | — | — | 3 | — | 1 | 1 | » » |
| Kontrollen | — | — | 2 | 1 | 1 | 1 | kompl. » |

## C. Differenzierungsversuche in der Gruppe der Typhusbazillen.

Die Scheidung der echten Typhusbazillen (Eberth-Gaffky) von den Paratyphusbazillen sowie gewissen Bakterien der Fleischvergiftung vom Typus Bac. enteritidis Gärtner unterliegt in den meisten Fällen keinen Schwierigkeiten; dieselbe kann nicht nur durch den Züchtungsversuch erfolgen, sondern auch durch die Anstellung der Immunitätsreaktionen, vor allem der Agglutination und des bakteriolytischen Versuches.

Was zunächst die Agglutinationsreaktion betrifft, so stimmen die Angaben der meisten Autoren darin überein, dafs durch dieselbe eine zuverlässige Differenzierung erreicht werden kann, doch es fehlt nicht an Angaben, welche den Wert der Gruber-Widalschen Reaktion für die spezifische Diagnose von Typhus und Paratyphus bezweifeln. Namentlich hat Jürgens[1]) gefunden, dafs das Blutserum einer Reihe von Typhuskranken auch den Paratyphusbazillus B. in erheblichen Verdünnungen und zwar häufig ebenso stark als den Typhusbazillus zu agglutinieren imstande ist. Andere Autoren, z. B. Korte und Steinberg[2]), fanden im Gegensatze hierzu in allen Fällen von echtem Typhus den Agglutinationstiter gegenüber den Typhusbazillen höher als gegenüber den Paratyphusbazillen. Für die Möglichkeit einer sicheren Differenzierung von Typhus- und Paratyphusbazillen mit Hilfe der Agglutination sprechen sich auch Kolle und seine Mitarbeiter[3]) auf Grund von umfassenden Versuchen aus, bei denen sich das eindeutige Resultat ergab, dafs ein hochwertiges Typhusimmunserum vom Agglutinationstiter 1 : 5000 bis 1 : 10000 eine Mittagglutination der Paratyphusbazillen höchstens bis zur Verdünnung 1 : 200 erzeugte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Agglutinationsreaktion standen auch

1) Jürgens, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, 1903, Bd. 43, S. 372.

2) Korte u. Steinberg, Münchner med. Wochenschr., 1905, S. 985.

3) Kolle, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, 1906, S. 287.

die Beobachtungen der genannten Autoren über aktive Immunität, indem die mit Paratyphusbakterien vorbehandelten Tiere keine Immunität gegenüber der Infektion mit Typhusbakterien besafsen.

Auch der Pfeiffersche Versuch zeigt, dafs sich die Bakteriolysine eines hochwertigen Typhusimmunserums nur gegen Typhusbazillen wirksam erweisen, niemals gegen typhusähnliche, so dafs also auch diese Reaktion absolut spezifische Ausschläge gibt.

Schwieriger dagegen gestaltet sich die Trennung der Paratyphusbazillen von den Bakterien der sog. Hogcholeragruppe, zu welcher die Bakterien der Fleischvergiftung, der Mäusetyphus und der Bazillus der Schweinepest gehören.

Hochwertige Agglutinationssera, die durch Immunisierung von Tieren mit einer der drei genannten Bakterienarten erhalten werden, beeinflussen ganz gleichartig nicht nur den homologen Stamm, sondern auch die beiden übrigen Stämme, ebenso wie die bakteriolytischen Sera bei ihrer Verwendung zum Pfeifferschen Versuch eine vollständig gleiche Wirkung zeigen.

Es stand wohl zu erwarten, dafs man nach dem Bekanntwerden der Brauchbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung für die bakteriologische Diagnostik die Reaktion auch zur Erkennung und Differenzïerung des Typhus heranziehen werde. Und in der Tat sind schon eine Reihe von Angaben in der Literatur verzeichnet, die auf eine Verwendung des Phänomens für die Typhusdiagnose hinweisen. Hirschfeld[1]) hat bei der Untersuchung von Krankenseris durchwegs positive Resultate erhalten. Am frühesten erfolgte die Ablenkung am 6. bis 8. Tage der Erkrankung; auch bei zwei Fällen mit negativer Gruber-Widalscher Reaktion wurde ein positiver Ausfall im Komplementablenkungsversuch erzielt.

Moreschi[2]), der sich ein Urteil über den Wert des Komplementablenkungsverfahrens in der bakteriologischen Diagnostik

1) Hirschfeld, Zeitschrift für klinische Medizin, 61. Bd., 1907.

2) Mornschi, Berliner klin. Woccheuschr., 1906, S. 1243.

verschaffen wollte, wählte hierzu Typhusbakterien und Typhusimmunsera, in der Absicht, die Brauchbarkeit der Methode an einer Bakterienart und dem entsprechenden Antiserum zu studieren, bei welchen der Mechanismus und das Wesen der Immunität näher erforscht sind. Die Resultate seiner Versuche, die er mit Vollbakterien durchführte, gipfeln in dem Schlufssatze, dafs wenigstens für Typhus das Komplementablenkungsverfahren nicht den Erwartungen entspricht, die man auf Grund der früheren Veröffentlichungen auf dasselbe zu setzen berechtigt war. Diese Resultate liefs bald darauf Wassermann durch Leuchs[1]) nachprüfen, der die Behauptung aufstellte, dafs die Komplementbindungsmethode auch bei der Typhusgruppe zum Nachweis bakterieller Antistoffe und damit umgekehrt auch zum Nachweis geringer Mengen gelöster Bakteriensubstanz sehr gut geeignet sei. Nach Leuchs steht auch der spezifische Charakter der Reaktion aufser Zweifel, da ein Immunserum immer nur durch homologe Bakterienextrakte in höherem Mafse beeinflufst wird, während mit heterologen Extrakten das antikörperhaltige Serum keine stärkere Hemmung zeigt als ein Normalserum.

Wir beabsichtigen, durch unsere Versuche zweierlei Fragen zu entscheiden, erstens, ob sich durch das Komplementbindungsverfahren eine Scheidung des Typhusbazillus von typhusähnlichen mit derselben Sicherheit durchführen läfst als dies mit den übrigen Serumreaktionen möglich ist, zweitens, ob sich vielleicht mit Hilfe dieser feinen biologischen Reaktion Unterscheidungsmerkmale zwischen Paratyphus B. Bazillen und den Erregern des Mäusetyphus herausfinden lassen. Zu diesem Zwecke wurden, wie die folgenden Tabellen zeigen, Typhus-Koli- und Typhus murium Immunsera mit homologen und verschiedenen heterologen Bakterienextrakten nach der schon früher geschilderten Methodik der Auswertung unterzogen.

1) Leuchs, Berliner klin. Wochenschr., 1907, Nr. 3 u. 4, S. 68 u. 107.

Tabelle VII.

Auswertung eines Typhusimmunserums (3 Injektionen i. v.) mit Hilfe des Komplementablenkungsverfahrens gegen homologe und verschiedene heterologe Bakterienextrakte.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | 1 : 2000 |
| Typhus (Kruse) Immunserum | Typhus- (Kruse) Bazillen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | große Kuppe | kleine Kuppe |
| | Typhus-(Paltauf) Bazillen | » | » | » | » | » | große Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett |
| | Paratyphus B-Bazillen | » | » | große Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett | f. komplett | — | — |
| | Typhus murium-Bazillen | » | » | » | » | » | » | — | — |
| | Kolibazillen | Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett | » | » | — | — |
| | Cholera-vibrionen | » | kleine Kuppe | f. komplett | » | — | — | — | — |
| | Staphylokokken | kleine Kuppe | f. komplett | » | » | — | — | — | — |

Tabelle VIII.

Auswertung eines Koliimmunserums (2 Injektionen subkutan) gegen homologe und verschiedene heterologe Bakterienextrakte.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | 1 : 2000 |
| Koli- (Br) Serum | Koli- (Br) Bazillen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | große Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett |
| | Typhus-(Paltauf) Bazillen | große Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett | f. komplett | f. komplett | — | — |
| | Paratyphus B-Bazillen | » | große Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | » | » | — | — |
| | Typhus murium-Bazillen | » | » | » | » | » | » | — | — |
| | Cholera-vibrionen | Kuppe | Kuppe | f. komplett | f. komplett | — | — | — | — |
| | Staphylokokken | » | kleine Kuppe | » | » | — | — | — | — |

Tabelle IX.

Auswertung eines Typhus murium-Immunserums (2 Injektionen i. V.) gegen homologe und heterologe Bakterienextrakte.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | 1:2000 |
| Typhus murium-Immunserum | Typhus murium-Bazillen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett | f. komplett |
| | Paratyphus B-Bazillen | » | » | » | grofse Kuppe | kleine Kuppe | » | kleine Kuppe | » |
| | Typhus (Paltauf)-Bazillen | kleine Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett | f. komplett | f. komplett | f. komplett | — | — |
| | Typhus (Kruse)-Bazillen | Hemmung | » | kleine Kuppe | » | » | » | — | — |
| | Koli (Br)-Bazillen | grofse Kuppe | Kuppe | f. komplett | » | » | » | — | — |
| | Choleravibrionen | » | » | » | » | — | — | — | — |
| | Staphylokokken | » | » | » | » | — | — | — | — |

Die Agglutinationsverhältnisse dieser drei Immunsera gegenüber den homologen und heterologen Bakterien gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

Tabelle X.

| Verdünnungsgrad des Serums | Typhus- (Kruse) Immunserum ÷ | | | | Koli- (Br) Immunserum ÷ | | | | Typhus murium-Immunserum + | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Typhus-(Kruse)-Bazillen | Typh. mur.-Bazillen | Paratyph. B-Bazillen | Kolibazill. | Kolibazill. | Typhus-(Paltauf) Bazillen | Typh. mur.-Bazillen | Paratyph. B-Bazillen | Typh. mur.-Bazillen | Paratyph. B-Bazillen | Typhus-(Paltauf) Bazillen | Kolibazill. |
| 1:20 | [illegible] | [illegible] | + + | + + | +++ | + | 0 | 0 | +++ | +++ | +++ | + + |
| 1:50 | +++ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 0 | + |
| 1:100 | +++ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 0 | 0 |
| 1:200 | +++ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ | 0 | 0 |
| 1:500 | ++ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ | 0 | 0 |
| 1:1000 | ++ | — | — | — | ++ | 0 | 0 | 0 | + | + | — | — |
| 1:2000 | ++ | — | — | — | + | — | — | — | 0 | 0 | — | — |

Die in den vorstehenden Tabellen VII, VIII und IX angeführten Ablenkungsversuche wurden alle an demselben Tage und mit denselben Extraktflüssigkeiten durchgeführt. Die gleichzeitig mit diesen Versuchen angelegten Kontrollen sind aus der folgenden Tabelle XI ersichtlich.

Tabelle XI.

Kontrollen für die Komplementablenkungsversuche der Tabellen VII, VIII u. IX.

| Art des Serums | Extrakt von | Physiologisch. Kochsalzlösung | Komplement (Meerschweinchenserum 1 : 20) | | Ambozeptor (Kaninchenserum 1 : 200) | 5 proz. Rinderblutaufschwemmung | Resultat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Typhus (Kruse)-Serum 1 ccm der Verdünnung 1 : 10 | — | 1 ccm | 1 ccm | | 1 ccm | 1 ccm | Lyse |
| Koli (Br)-Serum 1 ccm der Verdünnung 1 : 10 | — | » | » | | » | » | » |
| Typhus murium-Serum 1 ccm der Verdünnung 1 : 10 | — | » | » | | » | » | » |
| — | Typhus (Kruse)-Bazillen Typhus (Paltf.)-Bazillen Typhus murium Bazillen Kolibazillen Choleravibrion. Staphylokokken u. zwar je 1 ccm | je 1 ccm | je 1 ccm | eine Stunde bei 37° C. | je 1 ccm | je 1 ccm | in allen Fällen komplett. Lyse |
| Normalserum von Kaninchen u. zwar 1 ccm der Verdünnung 1 : 20 | Typhus (Kruse)-Bazillen Typhus (Paltf.)-Bazillen Typhus murium-Bazillen Kolibazillen Choleravibrion. Staphylokokken u. zwar je 1 ccm | — | » | | » | » | do. |
| — | — | 4 ccm | — | | — | 1 ccm | kein. Lyse |
| — | — | 3 ccm | 1 ccm | | — | » | » |
| — | — | 3 ccm | — | | 1 ccm | » | » |
| — | — | 2 ccm | 1 ccm | | » | » | kompl. L. |

Das Typhus-(Kruse) Immunserum läfst im Vereine mit den homologen Typhus-(Kruse) Bakterien eine vollständige Hemmung noch in der Verdünnung 1:500 erkennen; fast ebenso hoch reicht der Hemmungstiter mit dem Extrakt von Typhus-(Paltauf) Bazillen. Mit dem Extrakt von Paratyphus B und Typhus murium-Bazillen ist vollständige Hemmung nur bei der Verdünnung 1:20 vorhanden, während mit den Extrakten von verschiedenen heterologen Bakterienarten auch bei 1:10 keine Hemmung wahrnehmbar ist. Aus der Tabelle XI geht hervor, dafs normales Kaninchenserum bei der Verdünnung 1:20 mit den verschiedenen Extrakten in allen Fällen komplette Lyse zeigte.

Die Reaktion zur Erkennung der spezifischen Antikörper im Typhusimmunserum ist also mit Rücksicht auf den bedeutend höheren Hemmungstiter beim Versetzen des Immunserums mit dem homologen Bakterienextrakt als eine spezifische zu bezeichnen. Da aber auch die Extrakte von Paratyphus B und Typhus murium Bazillen mit dem gleichen Immunserum bei der Serumverdünnung 1:20 eine Hemmung erkennen liefsen, so ist auch durch diese Methode wie bei der Agglutinationsreaktion eine Mitbeeinflussung eines Immunserums durch heterologe Bakterienextrakte nachweisbar. Beim Koliimmunserum trat eine solche Beeinflussung weniger zutage; das Immunserum hemmte in diesem Falle mit dem homologen Bakterienextrakt bei 1:100, während es bei Verwendung von heterologen Extrakten auch bei der Serumverdünnung 1:10 niemals zu einer vollständigen Hemmung kam.

Was die Schärfe der Reaktion im Vergleiche zur Agglutinationsreaktion anbelangt, so zeigen unsere vergleichenden Versuche, dafs durch die Methode der Komplementfixation eine ebenso feine Bestimmung eines Immunserums dieser Gruppe erzielt werden konnte, wie durch das Agglutinationsverfahren. Überall dort, wo Nebenagglutinine nachweisbar waren, war es auch im Komplementablenkungsverfahren bei Heranziehung der entsprechenden heterologen Extrakte zur Hemmung, allerdings nur in verhältnismäfsig geringem Grade, gekommen. Gegenüber der Agglutinations-

methode aber leidet das neue Verfahren an dem Übelstande, dafs es schwer möglich ist, Extraktflüssigkeiten von konstanter Wirksamkeit zu erhalten. Die Dosen des zur Verwendung gelangenden Extraktes müssen in jedem einzelnen Falle ausprobiert werden, denn die Flüssigkeiten zeigen solche Schwankungen in ihrer Wirksamkeit, dafs durch eine Aufseracbtlassung dieser Vorsicht leicht Fehlerquellen geschaffen werden können.

Die Tabellen VII und IX lehren überdies noch, dafs sich Typhus murium-Bazillen und Paratyphus B-Bazillen auch im Komplementbindungsversuch nahezu gleich verhalten. Das Typhus murium-Serum zeigte nur beim Versetzen mit Extrakten von Typhus murium- und Paratyphus B-Bazillen in höheren Verdünnungen Hemmung.

Fafst man die Resultate unserer Versuche bei der Typhus-Koli-Gruppe kurz zusammen, so ergibt sich, dafs sich ein Immunserum, das durch Behandlung von Tieren mit Mikroorganismen dieser Gruppe gewonnen wurde, mit Hilfe der Komplement ablenkungsreaktion sicher auf seine Provenienz diagnostizieren läfst. Das Verfahren gibt zwar ebenso scharfe und spezifische Ausschläge wie die Agglutinationsreaktion, ist aber in der Durchführung viel komplizierter und von verschiedenen unvorhergesehenen Zufälligkeiten abhängig, so dafs mindestens bei agglutinierbaren Mikrobien die Agglutinationsmethode als das einfachere, bequemere und verläfslichere diagnostische Hilfsmittel angesprochen werden mufs.

### D. Differenzierungsversuche in der Vibrionengruppe.

Bezüglich der Verwertbarkeit der Immunitätsreaktionen, speziell der Agglutination und des Pfeifferschen Versuches für die Differenzierung der asiatischen Cholera von choleraähnlichen Vibrionen wird wohl allgemein der Standpunkt eingenommen, dafs die genannten Reaktionen durchaus spezifische Resultate liefern und eine unzweideutige Antwort auf die Frage geben, ob man es mit einer echten Cholerakultur zu tun hat oder nicht.

Die Vibrionengruppe ist besonders dadurch ausgezeichnet, dafs sich in ihr der spezifische Charakter der Immunitätsreaktionen in sinnfälliger Weise ausprägt, da Nebenagglutinine in jener Höhe wie bei Typhusbazillen und denselben nahestehenden Mikrobienarten in dieser Gruppe nicht vorkommen. Diese Tatsache wurde durch die umfassenden Versuche von Kolle und Gotschlich[1]) ermittelt und später durch die spezifischen Bindungsversuche von Hetsch und Lentz[2]) bestätigt und erweitert. Ebenso wie die Agglutinationsreaktion, bildet auch der Pfeiffersche Versuch ein absolut zuverlässiges Differenzierungsmittel der asiatischen Cholera von choleraähnlichen Vibrionen.

Es war wohl nach dem Ausfall unserer Komplementablenkungsversuche in der Typhusgruppe von vornherein zu erwarten, dafs diese Reaktion auch für die Differenzierung von echter Cholera und choleraähnlichen Vibrionen verwendbare Resultate liefern werde. Der Ausfall unserer Versuche hat diese Annahme in vollstem Mafse bestätigt.

Die Methode der Komplementfixation wurde übrigens schon früher von Markl[3]) dazu verwendet, um die von Gotschlich isolierten El-Tor-Stämme, die von letzterem, sowie von Gaffky, Kolle und Meinecke als echte Cholera auf Grund von Agglutinationsversuchen erklärt wurden, bezüglich ihrer Identität mit Cholera zu prüfen. Aus den Versuchen Markls, der nach der Methode von Bordet und Gengou mit Vibrionenaufschwemmungen als Antigenen arbeitete, ist zu entnehmen, dafs die El-Tor-Vibrionen mit Cholera-Immunserum prompte Hämolyse erzeugten, während in den Gemischen von El-Tor-Vibrionen und El-Tor-Immunsera fast in allen Versuchen vollständige Hemmung eintrat. Markl schliefst aus diesen Versuchen, dafs im Rezeptorenapparat der Cholerastämme und der El-Tor-Stämme Unterschiede bestehen, welche an der vollständigen Identität der

1) Kolle u. Gotschlich, Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 44, 1903, S. 1.

2) Hetsch u. Lentz, Festschrift für R. Koch.

3) Markl, Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. XLII, 1906, S. 380.

El-Tor-Stämme mit echten Choleravibrionen Zweifel aufkommen lassen.

Bei unseren Versuchen erwies sich das Komplementablenkungsverfahren als ein scharfes und zuverlässiges Differenzierungsmittel, um asiatische Cholera (Cholera Baku und Cholera Saratow) von choleraähnlichen Vibrionen (Vibrio Finkler-Prior, Vibrio Rumpel) zu trennen. Die Versuchsmethodik war die gleiche wie in den früheren Versuchen, indem auch hier behufs Indentifizierung der durch intravenöse Injektion von abgetöteten Kulturen gewonnenen Kaninchen-Immunsera abgestufte Serummengen mit je 1 ccm des an und für sich nicht hemmenden Extraktes versetzt wurden. Aufser den Extrakten von echter Cholera und den zwei verschiedenen Vibrionenarten wurde auch der Erfolg der Einwirkung von Typhusbazillenextrakt auf die Immunsera geprüft.

**Tabelle XII.**

**Auswertung eines Choleraimmunserums (3 Injektionen i. V.) gegen homologe und heterologe Bakterienextrakte.**

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | 1 : 2000 |
| Cholera (Saratow)-Immunserum | Cholera (Saratow)-Vibrionen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | grofse Kuppe | Kuppe | f. komplett |
| | Cholera (Baku)-Vibrionen | » | » | » | » | » | » | » | » |
| | Finkler Prior-Vibrionen | f. komplett | komplett | komplett | komplett | komplett | komplett | komplett | komplett |
| | Vibrio Rumpel | » | » | » | » | » | » | » | » |
| | Typhus (Paltauf) | » | » | » | » | — | — | — | — |

Tabelle XIII.

Auswertung eines Vibrio-Finkler Prior-Immunserums gegen homologe und heterologe Bakterienextrakte (3 Injektionen intravenös).

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | 1:2000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vibrio Finkler Prior-Immunserum | Vibrio Finkler Prior | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | groſse Kuppe | f. komplett | komplett |
| | Vibrio Rumpel | groſse Kuppe | groſse Kuppe | f. komplett | komplett | komplett | komplett | komplett | » |
| | Cholera (Saratow)-Vibrionen | » | » | » | » | » | » | » | » |
| | Cholera (Baku)-Vibrionen | » | » | » | » | » | » | » | » |
| | Typhus (Paltauf) | » | » | » | » | » | » | » | » |

Tabelle XIV.

Auswertung eines Vibrio Rumpel-Immunserums (3 Injektionen i. V.) gegen homologe und heterologe Bakterienextrakte.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | 1:2000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vibrio Rumpel-Immunserum | Vibrio Rumpel | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung | groſse Kuppe | f. komplett |
| | Vibrio Finkler Prior | groſse Kuppe | f. komplett | komplett | komplett | komplett | komplett | komplett | komplett |
| | Cholera (Saratow)-Vibrionen | » | » | » | » | » | » | » | » |
| | Cholera (Baku)-Vibrionen | » | » | » | » | » | » | » | » |
| | Typhus (Paltauf)-Bazillen | f. komplett | komplett | » | » | — | — | — | — |

Die nächstfolgende Tabelle zeigt die Agglutinationsverhältnisse dieser drei Immunsera an.

Tabelle XV.

| Verdünnungsgrad des Serums | Cholera (Saratow)-Immunserum + | | | | Vibrio Finkler Prior-Immunserum + | | | | Vibrio Rumpel-Immunserum + | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cholera (Saratow)-Vibrionen | Vibrio Finkler Prior | Vibrio Rumpel | Typhusbazillen | Vibrio Finkler Prior | Vibrio Rumpel | Cholera (Saratow)-Vibrionen | Typhusbazillen | Vibrio Rumpel | Vibrio Finkler Prior | Cholera (Saratow)-Vibrionen | Typhusbazillen |
| 1 : 10 | +++ | + | + | 0 | +++ | + | + | + | +++ | + | + | + |
| 1 : 20 | +++ | + | + | 0 | ++ | + | + | + | +++ | + | + | 0 |
| 1 : 50 | +++ | + | + | 0 | + | + | + | 0 | +++ | + | + | 0 |
| 1 : 100 | +++ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 200 | +++ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 500 | +++ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 1000 | ++ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 |
| 1 : 2000 | ++ | 0 | 0 | 0 | + ? | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Die in neuester Zeit von Schütze[1]) publizierten Untersuchungen, welche gleichfalls die Trennung der echten Cholera von choleraähnlichen Vibrionen zum Gegenstande hatten, stehen im Widerspruche mit den Angaben von Markl. Während nämlich nach letztgenanntem Autor die Extrakte der El-Torstämme mit Immunserum von echter Cholera in keinem Falle das zugefügte Komplement verankerten, wurde in den Versuchen von Schütze der aus El-Torstämmen bereitete Extrakt in fast ebenso intensiver Weise durch das Choleraimmunserum beinflufst, wie durch das El-Tor-Immunserum. Im übrigen stimmen die von Schütze erzielten Resultate mit den unsrigen überein. Auch Schütze spricht die Ansicht aus, dafs zwar das Komplementbindungsverfahren für die Differenzierung der echten Cholera von choleraähnlichen Vibrionen als unterstützender Behelf herangezogen werden könne, dafs aber die Agglutinationsreaktion das mafsgebende Kriterium für die Unterscheidung dieser Mikrobien darstelle.

1) Schütze, Berliner klinische Wochenschrift, Nr. 26, 1907, S. 800.

Wenn sich ferner bei Schütze in einzelnen Fällen eine erhebliche Beeinflussung des Extraktes von choleraähnlichen Vibrionen durch ein echtes Choleraimmunserum zeigte, während bei unseren Versuchen die Reaktion eine strenge Spezifizität erkennen liefs, so dürfte die Ursache hierfür in Verschiedenheiten in der Versuchsanordnung gelegen sein. Schütze arbeitete nämlich mit gleichbleibenden Dosen von Serum und fallenden Extraktmengen, während wir bei unseren Versuchen die Verdünnungen der Immunsera variierten und dieselben mit der gleichen, an und für sich nicht hemmenden Dosis des Bakterienextraktes versetzten. Die Resultate unserer Komplementsablenkungs- und Agglutinationsversuche können daher aus dem Grunde direkt miteinander in Vergleich gezogen werden, weil zu beiden Reaktionen die gleichen Serumverdünnungen benutzt wurden.

## E. Über den Zusammenhang des Phänomens der Komplementablenkung mit der Agglutination bzw. Präzipitation.

Eine nähere Verfolgung unserer bei der Gruppe der Kapselbazillen, der Typhus- und Choleragruppe erhaltenen Versuchsresultate läfst erkennen, dafs für die Differenzierung der Vertreter dieser drei Gruppen untereinander mit Hilfe der Komplementablenkungsmethode die besten Resultate bei jenen Mikroorganismenarten erzielt wurden, bei denen durch das Agglutinationsverfahren eine sichere Trennung erreicht werden kann. Am schärfsten verläuft die Reaktion in der Choleragruppe, bei welcher wir auch in der Agglutinationsreaktion ein streng spezifisches und praktisch brauchbares Merkmal für die Artunterscheidung der Vibrionen besitzen.

Weniger streng spezifisch als in der Vibrionengruppe verläuft im allgemeinen die Agglutinationsreaktion in der Typhusgruppe, in welcher eine Mitagglutination artsverwandter Mikrobien schon deutlicher hervor tritt. Es ist bei dieser Gruppe, um im Sinne der Ehrlichschen Vorstellungen zu sprechen, die Gemeinschaftlichkeit des Rezeptorenapparates schon eine

weitergehende, als dies bei der Vibrionengruppe der Fall ist. Dementsprechend liefs sich auch im Ablenkungsversuch eine Beeinflussung von Immunseris durch heterologe Extrakte bei solchen Verdünnungen wahrnehmen, wie dies bei der Vibrionengruppe niemals beobachtet werden konnte.

Bei der Gruppe der Kapselbazillen endlich, bei welcher die Agglutinationsmethode für differential-diagnostische Bestimmungen nur unter Zuhilfenahme von sehr komplizierten Vorsichtsmafsregeln in Verwendung gezogen werden kann, liefs auch die Komplementablenkungsreaktion für die Differenzierung der Vertreter der Gruppe keine eindeutigen Resultate erkennen.

Für die Bestimmung von Immunseris, die mit schwer agglutinierbaren Mikroorganismen hergestellt worden waren, hat die Methode der Komplementfixation nach unseren Versuchen wenig geleistet. Wir verwendeten hierzu Anthrax- und Staphylokokken-Immunsera. Über die Agglutinationsfähigkeit des Anthrax-Immunserums lauten die Literaturangaben recht widersprechend. Von einzelnen Autoren wurde zwar eine agglutinierende Wirkung des Serums auf Milzbrandbazillen beobachtet, doch ist diese Wirkung keine spezifische, da sie in vielen Fällen bei hochwertigen Milzbrandseris nicht vorhanden ist, anderseits auch nicht selten bei Normalserum beobachtet werden kann.

Auch die Agglutinationsfähigkeit der Staphylokokken-Immunsera ist keine regelmäfsige Eigenschaft derselben; wenn auch wiederholt festgestellt wurde, dafs ein mit menschenpathogenen Staphylokokken hergestelltes künstliches Immunserum den homologen Staphylokokkenstamm auch in höheren Verdünnungen agglutinierte, so stehen diesen Beobachtungen andere Angaben gegenüber, nach welchen die Versuche, durch Immunisierung Agglutinine hervorzurufen, inkonstante Resultate ergaben.

Im Antimilzbrandserum nach Sclavo hat Cler[1]) spezifische Ambozeptoren gefunden; er versetzte eine Emulsion von Milzbrandbazillen mit inaktiviertem Antimilzbrandserum und konnte wahrnehmen, dafs dieses Gemisch ein als Komplement zugesetztes frisches Kaninchenserum zu fixieren vermochte.

1) Cler, Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. 40, 1906, S. 241.

Unsere Versuche dagegen ergaben keine Anhaltspunkte dafür, dafs sich mit der Methode der Komplementfixation Antikörper im Serum der mit Anthraxbazillen und Staphylokokken vorbehandelten Tiere auffinden lassen. Auch in diesen Fällen verwendeten wir als Immuntiere Kaninchen, und zwar erhielt das Anthraximmuntier 6 mal lebende Kulturen des für Kaninchen nicht virulenten Stammes subkutan (das erste und zweite Mal je 1 Öse, die übrigen vier Male je eine ganze 24 stündige Agarkultur), das Staphylokokken-Immuntier 6 Injektionen von bei 60° C abgetöteten Staphylokokken-Agarkulturen (3 mal je 1 Agarkultur subkutan, 3 mal je $^1/_2$ Agarkultur intravenös).

Tabelle XVI.
Auswertung eines Staphylokokken- und Anthrax-Immunserums (je 6 Injektionen) mit homologen Bakterienextrakten.

| Art des Serums | Extrakt von | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 |
| Staphylokokken-Immunserum | Staphylokokken | grofse Kuppe | Kuppe | f. komplett | komplett | komplett | komplett |
| Anthrax-Immunserum | Anthraxbazillen | — | grofse Kuppe | » | » | » | » |

Die Auswertung der genannten Sera wurde wiederholt während der 3 monatlichen Immunisierungsdauer vorgenommen (nach der 3., 4. und 6. Injektion). In keinem Falle liefsen sich durch die Komplementablenkungsmethode Antikörper nachweisen; die Versuche ergaben eindeutig das in Tab. XVI verzeichnete Resultat.

Zweifellos läfst sich, wenn man unsere Versuchsresultate überblickt, ein Parallelismus zwischen agglutinierendem und komplementbindendem Vermögen unserer Immunsera erkennen; diese Tatsache fand noch dadurch eine Bestätigung, dafs wir uns in orientierenden Versuchen überzeugen konnten, dafs z. B. das Serum der mit Kapselbazillen immunisierten Tiere nach der ersten Injektion, zu einer Zeit also, zu welcher auch der Agglutinationstiter nur wenig angestiegen war, fast gar keine Hemmung im Komplementablenkungsversuche zeigte.

Es führten uns diese Wahrnehmungen zu der Frage, ob ein engerer Zusammenhang zwischen Agglutination und komplementablenkendem Vermögen der Immunsera besteht, und ob durch die Ermittelung dieses Zusammenhanges ein Einblick in das Wesen dieses interessanten biologischen Phänomens gewonnen werden könnte.

Denn über die Ursachen der Komplementablenkung liegen vor der Hand noch wenig geklärte und einheitliche Untersuchungsergebnisse vor, und wir wissen bis heute noch nicht, ob die bei der Komplementablenkung wirksame Substanz der Immunsera mit einer der uns bekannten Immunsubstanzen identisch ist. Während ein Teil der Forscher den unmittelbaren Zusammenhang der in Rede stehenden Erscheinung mit der Präzipitation, mit der höchst wahrscheinlich die Agglutination sehr nahe verwandt ist, betont, nimmt ein anderer Teil, namentlich Gengou[1]), Neifser und Sachs[2]), sowie Wassermann[3]) und seine Mitarbeiter zur Erklärung des Vorganges im Immunserum einen Zwischenkörper, Ambozeptor, an, der das Komplement bindet, während der Präzipitationsvorgang nur nebenbei verläuft.

Moreschi[4]), der ursprünglich den erstgenannten Standpunkt vertrat, hat schon in seiner ersten Abhandlung über die Lehre von den Antikomplementen darauf aufmerksam gemacht, dafs immer beim Zusammentreffen der beiden für die Präzipitation erforderlichen Komponenten (Präzipitin und Präzipitinogen) die Fixation des Komplementes erfolgt, dafs also diese antikomplementäre Wirkung mit dem Phänomen der Präzipitation »vergesellschaftet« sei.

Auch Gay[5]) hat die Vermutung ausgesprochen, dafs die Bindung des Komplementes durch die Entstehung des Präzipitates verursacht wird und führt als Beweis dafür an, dafs die Wirkung nicht nur während der Präzipitatbildung auftritt, sondern dafs sie auch dem fertigen Präzipitate zukommt.

---

1) Gengou, Annales de l'Institut Pasteur, Bd. XVI, 1902.
2) Neifser u. Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1905, S. 1388 u. 1906, S. 67.
3) Wassermann u. Bruck, med. Klinik, 1905, Nr. 55.
4) Moreschi, Berliner klin. Wochenschr., 1905, S. 1181.
5) Gay, Zentralblatt für Bakteriologie. Bd. 39, Heft 5.

Die zweite Hypothese, nach welcher es sich um Substanzen vom Charakter der Ambozeptoren handle, ist bereits von Gengou[1]) aufgestellt worden und es hat dieselbe zuerst in Neifser und Sachs Anhänger gefunden. Eine Stütze ihrer Ansicht finden die genannten Autoren darin, dafs auch dann, wenn keine Präzipitatbildung wahrzunehmen war, oft noch ein positives Ergebnis der Ablenkungsreaktion zutage trat, und dafs ferner die Stärke des Niederschlags und das Ablenkungsvermögen durchaus nicht in direkter Proportion stehen. Der gleichen Ansicht neigen sich auch Wassermann und Bruck zu. Sie gingen von der Wahrnehmung aus, dafs die Extrakte aus gewissen Bakterien, wie Typhusbazillen oder Meningokokken, in frisch bereitetem Zustande in grofser Menge präzipitable Substanz enthielten, dafs aber solche Extrakte oft nach wenigen Tagen die Fähigkeit verlieren, auch mit den stärksten Immunseris einen Niederschlag zu erzeugen. Indem sie nun verglichen, ob die Mischung von frisch bereitetem Bakterienextrakt und Immunserum zugesetztes Komplement in höherem Mafse absorbierten als abgelagerte Bakterienextrakte, zeigte sich, dafs das mechanische Moment der Präzipitierung gar keinen Einflufs auf das Verankern des Komplementes hat, da auch die älteren Extrakte das Komplement ebenso stark zum Verschwinden brachten als die frischen Extrakte.

Einen weiteren Beweis, dafs das Präzipitat als solches keineswegs allein die Ursache der Komplementablenkung bildet, konnte Friedberger[2]) dadurch erbringen, dafs es ihm gelang, beim Hinzufügen von Präzipitinogen zu erhitztem Präzipitinserum, wobei infolge der Erhitzung die Möglichkeit der Präzipitatbildung ausgeschlossen war, gleichfalls antikomplementäre Wirkung zu erreichen. Er hält für das Zustandekommen der Komplementablenkung nicht die Bildung eines sichtbaren Präzipitates sondern nur die Gegenwart der beiden für die Präzipitation erforderlichen Komponenten für notwendig.

---

1) Gengou, Annales de l'Institut Pasteur, 1902, S 735.

2) Friedberger, Deutsche medizinische Wochenschrift, 1906, Nr. 15.

In Anbetracht der unklaren Vorstellungen über das Wesen des Vorganges bei der Bindung des Komplementes war nun Liefmann[1]) bemüht, für jede der beiden Möglichkeiten Beweise zu erbringen. Sein Streben ging nun dahin, eine Präzipitation ohne komplementbindende Kraft oder eine Komplementbindung ohne präzipitierende Substanz zu erzielen. Vor allem verdient aus seinen Versuchen hervorgehoben zu werden, dafs diejenigen Sera, die gar keine oder nur eine schlechte Präzipitation gaben, auch keine oder nur eine geringe Komplementablenkung zustande brachten. Als besonders wichtig seien noch die Tatsachen erwähnt, dafs selbst 14 Tage alte Präzipitate noch Komplement zu binden vermögen, und dafs nach der Bildung des Niederschlages die komplementablenkende Substanz sich nicht in der überstehenden Flüssigkeit findet, während sich mit dem gewaschenen Niederschlag wohl eine Komplementablenkung erzielen läfst. Durch den Kältebindungsversuch Ehrlichs stellte sich heraus, dafs die Komplementbindung auch in der Kälte erfolgt, was nicht der Fall sein dürfte, wenn es sich um eine Ambozeptorwirkung handelte. Eine Reihe von Tatsachen als Folgerungen aus den Versuchen Liefmanns scheinen also gegen die Annahme einer Ambozeptorwirkung zu sprechen.

Um einen näheren Einblick über den Zusammenhang zwischen Agglutination und komplementablenkendem Vermögen der Immunsera zu gewinnen, waren wir bestrebt, bei gut agglutinierenden Seris die Agglutinine durch Eintragen von grofsen Mengen von Bakterienkulturen im Wege der spezifischen Absorption zu entfernen. Es ergab sich dabei das Resultat, dafs mit dem Entfernen der Agglutinine auch die für die Hemmung in Betracht kommenden Substanzen aus dem Serum verschwinden. Diese Erscheinung trat natürlicherweise nur dann ein, wenn die Absättigung des spezifischen Immunserums mit der homologen Bakterienart erfolgte; wurde dagegen das betreffende Serum mit Aufschwemmungen von heterologen Bakterien in der gleichen Menge als der Zusatz der homologen erfolgte, versetzt, so blieb der Hemmungstiter für den homologen Extrakt auch

1) Liefmann, Berliner klinische Wochenschrift, 1906, Nr. 15.

in dem von den Bakterien befreiten Serum in der gleichen Höhe wie im ursprünglichen Serum erhalten. Die Technik dieser Versuche gestaltete sich in der Weise, dafs gewöhnlich 1 ccm des inaktivierten Immunserums mit gemessenen Mengen von dichten Mikrobienaufschwemmungen versetzt wurden. Die Agglutination erfolgte bei 50° C; sobald keine Ausflockung mehr erfolgte, wurde sofort zentrifugiert und das klare Zentrifugat für sich allein und in Verbindung mit Extrakten auf hemmende Wirkung geprüft. Ein vollständiger einschlägiger Versuch ist in der folgenden Tabelle enthalten.

Tabelle XVII.

Der ursprüngliche Hemmungstiter des verwendeten Cholera-Immunserums betrug 1 : 500, der Agglutinationstiter 1 : 1500.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Zentrifugat von Cholera-Immunserum versetzt mit Choleravibrionen<br>Zentrifugat allein hemmt bei 1 : 20 | Zentrifugat + Choleraextrakt: Hemmung bei 1 : 20. Lyse bei 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000. | Zentrifugat + Extrakt von Typhusbazillen: Hemmung bei 1 : 20. Lyse bei 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500. 1 : 1000, 1 : 2000. | Zentrifugat + Extrakt von Kolibazillen: Hemmung bei 1 : 20. Lyse bei den übrigen Verdünnungen. |
| Zentrifugat von Cholera-Immunserum versetzt mit Typhusbazillen<br>Zentrifugat allein hemmt nicht bei 1 : 20. | Zentrifugat + Choleraextrakt: Hemmung bei 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 Lyse bei 1 : 500, 1 : 1000. | Zentrifugat + Typhusbazillenextrakt: Lyse bei 1 : 20 so wie in den übrigen Verdünnungen. | Zentrifugat + Kolibazillenextrakt: Lyse bei 1 : 20 sowie in den übrigen Verdünnungen. |
| Zentrifugat von Cholera-Immunserum versetzt mit Kolibazillen<br>Zentrifugat allein hemmt nicht bei 1 : 20. | Zentrifugat + Choleraextrakt: Hemmung bei 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500. Lyse bei 1 : 800 u. 1 : 1000. | Zentrifugat + Typhusbazillenextrakt: Lyse bei 1 : 20 sowie in den übrigen Verdünnungen. | Zentrifugat + Kolibazillenextrakt: Lyse bei 1 : 20 sowie in den übrigen Verdünnungen. |

Die vorstehende Tabelle demonstriert in besonders schöner Weise den unmittelbaren Zusammenhang zwischen Agglutination und Komplementablenkung bei einem gut agglutinierenden Immunserum. Bekanntlich lassen sich aus einem solchen Serum

durch die Methode der spezifischen Absorption die Hauptagglutinine durch Eintragen der homologen Bakterienart nahezu vollständig erschöpfen, während die Nebenagglutinine erhalten bleiben. Wird also, wie in unserem Beispiele, ein Choleraimmunserum mit Choleravibrionen bis zur Erschöpfung versetzt, und das von den agglutinierten Bakterien abzentrifugierte Serum mit Choleraextrakt auf Hemmung geprüft, so zeigt sich, dafs das seiner Agglutinine beraubte Serum auch die für die Hemmung in Betracht kommenden Substanzen verloren hat. Wird dagegen dasselbe Choleraimmunserum mit Typhus- und Kolibazillen in der gleichen Menge als der Zusatz der Choleravibrionen erfolgte, versetzt, so fallen zwar die etwa vorhandenen Typhus- bzw. Koliagglutinine aus dem Serum heraus, das Cholera-Hauptagglutinin aber bleibt vollständig erhalten und ebenso wie das Agglutinationsvermögen haben auch diejenigen Antikörper des Serums, die mit Choleravibrionenextrakten Ablenkung erzeugten, keine Einbufse erlitten. Dafs das Zentrifugat von Choleraimmunserum, versetzt mit Typhusbazillen, bei der späteren Auswertung mit Choleraextrakt statt bei 1 : 500 nur bei 1 : 200 vollständige Hemmung zeigte, dürfte entweder auf Titerschwankungen zurückzuführen sein, oder man mufs annehmen, dafs auf irgendeine Weise (Adsorption) ein Teil der hemmenden Substanzen ausgeschaltet wird.

Wir haben dieselbe Versuchsreihe, die im voranstehenden für das Choleraimmunserum ausführlich geschildert ist, noch mit anderen Immunseris durchgeführt und konnten bei den in Verwendung gezogenen Vibrio Rumpel-, Koli- und Typhus murium-Immunseris ähnliche Verhältnisse konstatieren. Überall also zeigte sich, dafs zwischen dem Agglutinations- bzw. Präzipitationstiter und dem Hemmungstiter eines solchen Immunserums ein enger Zusammenhang besteht.

Diese Tatsache konnte weiterhin noch dadurch bewiesen werden, dafs in einem Immunserum, bei welchem durch die spezifische Absorption das Hauptagglutinin nicht vollständig sondern nur teilweise entfernt worden war, auch der Ablenkungstiter des von den Bakterien nach der Absorption befreiten

Serums nur zum Teil herabsank. Es handelte sich dabei um ein Typhusimmunserum, dessen Agglutinationstiter sich ursprünglich auf über 1 : 2000, und dessen Hemmungstiter sich auf 1 : 1000 stellte. Trotz des wiederholten Eintragens von grofsen Mengen von Typhuskulturen gelang es uns nicht, die Agglutinine vollständig aus diesem Serum zu entfernen. Der Agglutinationstiter stellte sich nach der letzten Eintragung immer noch auf 1 : 500; der Ablenkungstiter des Absorbates erfuhr gleichfalls eine Herabsetzung, indem er von 1 : 1000 auf 1 : 200 herabsank.

In zwei Kapselbazillenimmunseris aber, aus welchen sich die Agglutinine durch Eintragen der homologen Bakterien in unverändertem Zustande entweder gar nicht oder nur in ganz geringer Menge entfernen lassen, erfuhr durch diese Vorbehandlung der Ablenkungstiter nicht die geringste Reduktion. Die geschilderten Verhältnisse sollen an der folgenden Tabelle erläutert werden. Die Sera wurden hierzu mit dichten Aufschwemmungen von Kapselbazillen bis zur Verdünnung 1 : 10 versetzt, hierauf $^3/_4$ Stunden bei 50° C stehen gelassen und sodann mit der elektrischen Zentrifuge zentrifugiert.

Tabelle XVIII.

a) Auswertung eines Immunserums von Bacillus pneumoniae Friedländer.

| Art des Serums | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 |
| Friedl.-Immunserum vor dem Versetzen mit Friedl.-Bazillen + Extrakt von Friedl.-Bazillen | Hemmung | Hemmung | Hemmung | grofse Kuppe | kleine Kuppe | kleine Kuppe |
| Zentrifugat von Friedl.-Immunserum u. Friedl.-Bazillen + Extrakt von Friedl.-Bazillen | » | » | » | » | » | f. komplett |

Das Zentrifugat von Friedländer-Immunserum und Friedländer-Bazillen allein, ohne Zusatz von Extrakt, zeigte nur Hemmung bei 1 : 10.

b) Auswertung eines Rhinosklerom-Immunserums.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rhinosklerom-Immunser. vor dem Versetzen mit Rhinoskler.-Baz. + Extrakt von Rhinosklerom-Bazillen | Hemmung | Hemmung | grofse Kuppe | Kuppe | kleine Kuppe | f. komplett |
| Zentrifugat von Rhinosklerom-Serum u. Rhinoskl.-Bazillen + Extrakt v. Rhinoskler.-Bazillen. | » | » | » | » | » | — |

Das Zentrifugat von Rhinoskleromserum und Rhinosklerombazillen allein, ohne Zusatz von Extrakt, bewirkte bei der Verdünnung 1 : 20 eine komplette Lyse des hämolytischen Systems.

Den Absorptionsversuch benutzten wir weiterhin auch noch dazu, um zu entscheiden, ob vielleicht von diesem Gesichtspunkte aus sich biologische Differenzen zwischen Paratyphus B-Bazillen und Typhus murium-Bazillen ergeben. Denn da der Hemmungstiter eines Immunserums nur dann eine Herabsetzung erfährt, wenn dieses Serum mit der homologen Bakterienart versetzt wird, so müfsten, wenn die genannten Mikrobien nicht vollständig identisch wären, sich Differenzen beim Absättigen eines Immunserums mit den entsprechenden Mikroorganismen und nachherigem wechselseitigem Auswerten ergeben. Dafs dies aber nicht der Fall ist, zeigt die folgende Tabelle. Der Ablenkungstiter des verwendeten Immunserums vor der Absorption betrug 1 : 100.

Tabelle XIX.
Auswertung eines Typhus murium-Immunserums nach dem Versetzen mit Typhus murium- und Paratyphus B-Bazillen.

| Art des Serums | Verdünnungsgrad des Serums | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 |
| Zentrifugat von Typhus murium-Immunserum u. Typhus mur.-Baz. allein, ohne Zusatz von Extrakt. | Hemmung | kleine Kuppe | f. komplett | komplett | komplett | komplett |
| Zentrifugat v. Typhus mur.-Immunserum u. Typhus murium-Baz. + Extrakt von Typhus murium-Baz. | — | » | » | » | » | » |
| Zentrifugat v. Typhus mur.-Immunserum u. Typhus murium-Baz. + Extrakt von Paratyphus-Bazillen | — | » | » | » | » | » |
| Zentrifugat v. Typhus mur.-Immunserum u. Paratyphus B-Bazillen allein, ohne Zusatz von Extrakt. | grofse Kuppe | » | » | » | » | » |
| Zentrifugat von Typhus murium-Serum u. Paratyphus B-Bazillen + Extrakt von Typhus murium-Baz. | — | » | » | » | » | » |
| Zentrifugat von Typhus murium-Serum u. Paratyphus B-Bazillen + Extrakt von Paratyphus B-Bazillen | — | » | » | » | » | » |

### F. Schlufsbemerkungen.

Die Antikörper, mit deren Produktion der tierische Organismus auf die Einverleibung von geformtem Zelleiweifs (Bakterien) antwortet, lassen sich in Agglutinine bzw. Präzipitine und lytische Ambozeptoren scheiden. Von den Reaktionsprodukten bei der Immunisierung durch ungeformtes Eiweifs kennt man bisher mit Sicherheit nur die Präzipitine; dafs aber dabei auch Substanzen von dem Charakter der Ambozeptoren entstehen können, glaubte man durch die komplementbindende Funktion der Eiweifsantikörper erschliefsen zu können. Es wird also durch diese Hypothese ein neuer Stoff im Immunserum angenommen, der von den bisher bekannten Substanzen getrennt werden müfste. Die Kardinalfrage ist, ob eine zwingende Notwendigkeit vorliegt, die bei der Komplementablenkung wirksame Substanz als ein neues, bisher unbekanntes Reaktionsprodukt aufzufassen, oder ob dieselbe mit einer der bekannten Immunsubstanzen identifiziert werden könne. Der Ausfall unserer Versuche, sowie verschiedene in der Literatur verzeichnete Angaben sprechen dafür, dafs das komplementablenkende Vermögen mit der Agglutinations- bzw. Präzipitationsfähigkeit gleichen Schritt hält, daher mit diesen Eigenschaften der Immunsera in der engsten Beziehung stehen mufs. Am besten eignen sich für den Ablenkungsversuch die spezifischen präzipitierenden Sera, die durch Vorbehandlung von Tieren mit gelösten Eiweifssubstanzen erzeugt werden, und bei denen gewöhnlich schon die Präzipitinreaktion so scharfe Ausschläge gibt, dafs dieselbe zur Erkennung bestimmter Eiweifsarten ein äufserst zuverlässiges Reagenz darstellt. Das Komplementablenkungsverfahren ergibt hierbei in vielen Fällen noch in solchen Verdünnungen des Serums ein positives Resultat, bei welchem das Präzipitat mit freiem Auge nicht mehr wahrgenommen werden kann.

Es scheint in diesem Falle die Hemmung der Hämolyse nur eine schärfere Anzeige für die erfolgte Präzipitatbildung zu sein, ähnlich wie bei der Jodtitration der Zusatz von Stärke-

kleister den Endpunkt der Reaktion augenfälliger macht. Man könnte also gewissermafsen den Zusatz von Komplement und hämolytischem System zu den aufeinander reagierenden Substanzen als einen Indikator auffassen, der die Präzipitinreaktion auch dann noch deutlich sichtbar macht, wenn der gebildete Niederschlag unserer Wahrnehmung entgeht.

Bei den Immunseris, die durch Vorbehandlung von Tieren mit Mikroorganismen erhalten werden, geben diejenigen im Komplementbindungsversuch die besten Resultate, die auch durch den Agglutinationsversuch das Vorhandensein von Antikörpern erkennen lassen. Die Cholera-, Typhus- und Kapselbazillen-Immunsera bieten hierfür den deutlichsten Beweis; bei allen diesen Immunseris verläuft das komplementablenkende Vermögen parallel mit dem Agglutinationsvermögen. Wird letzteres durch die spezifische Absorption herabgesetzt oder ganz aufgehoben, dann erleidet auch das komplementbindende Vermögen, entsprechend dem Grade der Ausschaltung der Agglutination, eine Einbufse. Auch Vannod bestätigt, dafs alle Gonokokkensera, die im Ablenkungsversuch ein positives Resultat ergaben, einen entsprechenden Gehalt an Agglutininen aufwiesen. Anderseits wiederum konnte der von Wassermann und Bruck geführte Nachweis von Antikörpern gegen Tuberkelbazillenpräparate von Morgenroth und Lydia Rabinowitsch[1]) nicht bestätigt werden und auch bezüglich des Luesantikörpernachweises, der von Weil[2]) angezweifelt wurde, wird man sich zunächst noch abwartend verhalten müssen.

Letztgenannter Autor führte den Nachweis, dafs Tumorextrakte von Personen, die niemals Lues durchgemacht hatten, mit dem Blute von Luetikern Komplementbindung zeigten. Er erklärt sich dieses Verhalten dadurch, dafs gelöste Gewebsstoffe mit dem Blutserum eine Reaktion geben, die nach Art eines Präzipitationsvorganges Komplement absorbiert.

---

1) Morgenroth u. Lydia Rabinowitsch, Deutsche med. Wochenschrift, 1907, Nr. 18.

2) Weil, Wiener klin. Wochenschrift, 1907, Nr. 18.

Einen höchst wichtigen und interessanten Beitrag zu dieser Frage liefert übrigens die kürzlich erschienene Publikation von Fornet und Schereschewsky[1]), nach welcher das Serum von Paralytikern und Tabikern mit dem Serum von Luetikern eine positive Präzipitinreaktion ergab. Auch aus diesen Befunden erhellt der enge Zusammenhang, der zwischen Komplementbindung und Präzipitinreaktion besteht.

Für den Nachweis spezifischer Stoffe bei Hundswut ergab nach Heller und Tomarkin[2]) die Methode der Komplementbindung negative Resultate und im Immunserum mit Vaccina geimpfter und intravenös immunisierter Rinder liefsen sich keine spezifischen Stoffe erkennen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden stehen auch die Ergebnisse von Friedberger[3]), nach welchen das Komplementablenkungsverfahren für Lyssa kein positives Resultat liefert.

Ob diese negativen Resultate und die ungünstigen Erfolge bei der Nachprüfung der Versuche Wassermanns und seiner Mitarbeiter bei Tuberkulose und Lues die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung zum Nachweis von Antikörpern bei solchen Immunseris, bei welchen unsere bisherigen Methoden versagen, in Frage stellen, entzieht sich unserer Beurteilung, da uns darüber praktische Erfahrungen nicht zu Gebote stehen. Das eine aber dürfte zweifellos sicher stehen, dafs die Methode, welche durch eine bisher nicht geübte Art des Antikörpernachweises eine Bereicherung unserer seradiagnostischen Methoden darstellt, den Wert der Agglutinationsreaktion in keiner Weise zu beeinträchtigen vermag.

1) Fornet u. Schereschewsky, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 30, S. 1471.

2) Heller u. Tomarkin, Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 20.

3) Friedberger, Wiener klin. Wochenschr., 1907, Nr. 29, S. 879.

# Ein neuer Apparat zur Bestimmung des absoluten Volumens der Baumaterialien und der Erdmassen.

Von

**Ing. Riccardo Bianchini.**

(Hygienisches Institut der Kgl. Universität Turin. Direktor: Prof. Dr. L. Pagliani.)

Nicht wenige Apparate wurden schon erdacht zur Bestimmung des absoluten Volumens der Körper, doch fast alle lieferten nur wenig genaue Resultate, viele hatten auch den Übelstand an sich, dafs das Material durch die zur Bestimmung nötigen Operationen seine Brauchbarkeit verlor, was in vielen Fällen nicht geringen Schaden verursachte.

Da ich nun zu einer Reihe von Untersuchungen, die ich nächstens veröffentlichen werde, innerhalb gewisser Empfindlichkeitsgrenzen genauer Bestimmungen bedurfte, erdachte ich mir den nachstehend beschriebenen Apparat, mit dem ich bei relativ einfacher Technik zufriedenstellende Resultate erhielt. Ich möchte denselben daher allen denen empfehlen, die besonders auf die physikalischen Eigenschaften der Materialien eingehen wollen.

Das dem Apparat zugrunde liegende Prinzip ist das bekannte physikalische Gesetz, wonach das Volumen bestimmter Gasquantitäten unter sonst gleichen Bedingungen im umgekehrten Verhältnis steht zu ihrem Druck. Auf diesen Grund stellten sich zwar auch schon andere Apparate, doch liefs sich mit ihnen kein zur Bestimmung hinreichend genaues Resultat erhalten.

Nach Voranschickung dieser allgemeinen Angaben sei es mir nun gestattet, den Apparat selbst näher zu beschreiben und dann die entsprechende Theorie anzuschliefsen.

Ein walzenförmiges Glasgefäfs, das je nach den auszuführenden Bestimmungen — zu Laboratoriumszwecken genügen gewöhnlich



Fig. 1.

5 cm Innenmafs — vermittelst zweier Arme aus Glas mit einem besonderen Manometer, bezw. mit einem fest an eine graduierte Bürette angeschlossenen Zapfenhahn in Verbindung steht.

Das Manometer besteht aus zwei Röhren (s. Fig. 1), einer vertikalen von 10 mm innerem Durchmesser und einer Kapillarröhre von 1 mm Durchmesser, die aufsen Zentimeter- und Millimetereinteilung trägt und der ersteren gegenüber eine Inklination von 75° hat. Diese letztere Röhre ist dann an ihrem Aufsenende etwas ausgebaucht und besitzt einen dicht abschliefsenden Einweg-Glashahn.

Die Ausbauchung dient zur Einführung der Manometerflüssigkeit, der Hahn dagegen kann zur Ladung des gesamten Apparats verwendet werden. Dieses Manometer mufs mit dem zylindrischen Hauptgefäfs auf $^2/_3$ Höhe — vom Boden des Hauptgefäfses ausgerechnet — in Verbindung stehen.

Der andere, vom Glasgefäfs ausgehende Arm dagegen mufs an einer nahe am Boden des zylindrischen Glasgefäfses gelegenen Stelle austreten und in einen Hohlhahn auslaufen, der dann einen auf der Vorderseite mit der graduierten Bürette in Verbindung stehenden Zapfenhahn empfangen soll. Dieser Hahn ist derart konstruiert, dafs bei beliebiger Neigung der graduierten Bürette beständig eine Verbindung zwischen dem Gefäfs und besagter Bürette besteht; dies wird ermöglicht durch ein System von Einbuchtungen und Löchern, wie solches bei dem »Volumenometer mit direkter Ablesung«, der (I) von Dr. Cler und dem Verfasser in Vorschlag gebracht worden ist, beschrieben wurde. Die Bürette selbst trägt vor der Gradeinteilung einen gewöhnlichen Hahn.

Die Einteilung gibt in dem dem Hahn zunächst liegenden Teil ccm und $^1/_{10}$ ccm an, in dem hochgelegenen, bedeutend engeren Teile dagegen lassen sich $^1/_{100}$ ccm ablesen.

Im oberen Teile verengert sich das Glasgefäfs leicht, ist ebenda fein geschmirgelt und trägt einen hermetisch abschliefsenden Deckel mit geschmirgelten Wänden. Im obersten Teile schliefst sich an diesen Deckel als Verlängerungsstück eine kurze Röhre an, die mittels eines gewöhnlichen Hahns luftdicht abgeschlossen werden kann.

Die ganze Vorrichtung steht in einem Holzgestell, das genügend breit sein mufs, damit dem Ganzen die erforderliche Standfestigkeit gewahrt bleibt.

Verwendung des Apparats. Man füllt das Glas bis zu $^2/_3$ Totalgehalt mit gut gereinigtem und zuvor gekochtem Quecksilber an; zu gleicher Zeit läfst man dann auch in die seitlich gelegene Röhre im unteren Teil des Apparats Queck-

1) Bianchini R. u. Cler E., Ein neuer Apparat zur Bestimmung des spezifischen Gewichts der Baumaterialien. Arch. f. Hyg., Bd. 53, Heft 2, 1905.

silber eintreten, nötigenfalls läfst man es in die graduierte Bürette eintreten und bis zum Nullstrich der unteren Teilung ansteigen.

Mit einer einfachen Handhabung des ganzen Apparates wird dann gegen die kleinen, ev. im Quecksilber zurückgebliebenen Luftbläschen vorgegangen, wodurch dieselben an die Oberfläche hinaufgurgeln.

Nach Beendigung dieser Vornahme schliefst man das Glas mit dem Deckel und offenem Hahn, öffnet auch den Hahn des Manometers und führt in diesen letzteren solange destilliertes und gekochtes Wasser ein, bis der Schwimmer sich in der Nähe des Nullstriches der Kapillarröhre befindet.

Hier angelangt, ist der Apparat fertig zum Gebrauch. Immerhin aber ist es angeraten, noch eine kurze Zeit zu warten, damit das Quecksilber und die in dem Gefäfs eingeschlossene Luft gleiche Temperatur annehmen können. Ist dann dieses thermische Gleichgewicht hergestellt, so schliefst man den Hahn des Deckels und zieht, indem man die Bürette nach unten drückt, eine bestimmte Quantität Quecksilber aus dem Glase. Das Manometer wird dann die innere Depression durch eine entsprechende Verschiebung der in ihm enthaltenen Flüssigkeit zum Ausdruck bringen.

Im Innern des Apparats mufs sich nun derselbe barometrische Druck vorfinden wie aufsen, nur vermindert um den, der der verschobenen Flüssigkeitskolonne entspricht. Es läfst sich also immer ganz genau feststellen, wie weit die Luft jeweils verdünnt worden ist, denn dazu braucht man nur die inklinierte Manometerröhre abzulesen und diese Ablesung mit der in Verbindung zu bringen, welche an der vertikalen Röhre vorzunehmen ist, was, wie wir sehen werden, nicht schwer fällt.

Ist diese Lesung vorgenommen, so öffnet man den Hahn der graduierten Bürette und stellt das Niveau des Quecksilbers wieder so her, wie es zu Anfang der Bestimmung gewesen war, und prüft dann nach, ob das Manometer seine frühere Stellung wieder eingenommen hat, womit man sich vergewissert, dafs die Luft des Gefäfsinnern die Temperatur des Quecksilbers angenommen hat. Hierauf wird der Apparat geöffnet und das Material-

stück, dessen Volumenbestimmung vorgenommen werden soll, auf eine eigens dazu im Innern des Gefäfses hergerichtete Stütze verbracht. Es wird nun der Deckel neuerdings an seine Stelle gebracht, zuvor aber dafür gesorgt, dafs der obere Hahn geöffnet wird, um zu verhindern, dafs sich im Innern des Apparats eine Steigerung des Luftdrucks bilde, und dann einige Minuten gewartet, damit von neuem der thermische Wechsel vor sich gehen kann, worauf der Hahn geschlossen wird, und, wie vorbeschrieben, durch Abwärtsbewegung der graduierten Bürette auf das Niveau des inneren Quecksilberspiegels eingewirkt wird.

Zur Ausführung der Bestimmung wird dann entweder eine Depression im Innern des Glases hervorgerufen, die der zuvor bewirkten und im Manometer abgelesenen gleich ist, und in diesem Falle wird Volumendifferenz des verschobenen Quecksilbers in Anrechnung gebracht; oder aber es wird ein gleiches Volumen Quecksilber entfernt, und dann bei der nachfolgenden Bestimmung das verschiedene Ergebnis der Manometerlesung ins Auge gefafst.

Theoretisch kann der Apparat, wie wir später sehen werden, ohne Unterschied für die beiden Bestimmungsarten verwendet werden, in der Praxis aber glaube ich auf Grund zahlreicher Versuche, dafs man rascher arbeitet, wenn man zur Bestimmung in den beiden aufeinanderfolgenden Versuchen die Verschiebung des Quecksilberniveaus konstant hält. Ich würde also dazu raten, die erst gegebene Methode nur zur Nachprüfung und in ganz besonderen Fällen zu verwenden, da es angesichts der aufsergewöhnlichen Empfindlichkeit des Manometers nicht leicht ist, zwei gleiche Lesungen zu erhalten, und dies um so mehr, als die Flüssigkeit erst nach einer gewissen Zeit (3 oder 4 Minuten) ins Gleichgewicht kommt. Anderseits ist es dem Experimentierenden immer gegeben, das innere Niveau der Quecksilberoberfläche mit annähernder Sicherheit um eine gegebene Quantität zu erniedrigen, da, wie sich aus dem theoretischen Teil ergeben wird, ein hierbei möglicher Fehler übergangen werden kann. Nur mufs eben vor der Ablesung des Manometers so lange ge-

wartet werden, bis die Flüssigkeit ihren stabilen Gleichgewichtszustand eingenommen hat.

Ist diese zweite Lesung vollbracht, so kann man, wie ich schon oben auseinandergesetzt habe, zur Nachprüfung übergehen, indem man den Apparat, ohne ihn mit der Aufsenluft in Verbindung zu bringen, in den ganz zu Anfang bestehenden Zustand zurückversetzt und dann prüft, ob diese Verhältnisse nacheinander wieder eintreten, was dann den Beweis geben würde, dafs man gut gearbeitet hat. Sind alle diese Vornahmen beendet, so kann das Glas geöffnet, das untersuchte Stück herausgenommen und ein anderes zu neuer Prüfung eingeführt werden.

Will man das absolute Volumen des in Prüfung stehenden Stückes feststellen, so verwendet man die nachstehend angegebene algebraische Formel, indem man an Stelle der Symbole die direkt aus der Untersuchung sich ergebenden Quantitäten einsetzt.

Theorie des Apparats. Wie ich bereits auseinandergesetzt habe, gründet sich der Apparat auf das bereits erinnerte physikalische Gesetz. Bezeichnet man dann in diesem besonderen Falle mit $V$ das Volumen der in dem Gefäfse eingeschlossenen Luft in dem von dem Quecksilber freigelassenen Raum; mit $H$ den atmosphärischen Druck im Moment des Experiments; mit $v$ die Vermehrung, die das primitive Luftvolumen $V$ durch Senkung des Quecksilberniveaus von $AA$ zu $BB$ erfahren hat, und die man auf der Bürette in $^1/_{100}$ ccm ausgedrückt lesen kann; und bezeichnet man dann mit $h$ die auf dem Manometer abgelesene Depression, der zufolge die im Innern des Gefäfses bestehende $H-h$ sein mufs, so erhält man: $V : V + v = H - h : H$, woraus man mit einfachen Umwandlungen erhält: $V = v\frac{H-h}{h}$. (1) Im zweiten Gliede ist alles bekannt, und es läfst sich somit auch das Volumen $V$ der in dem leeren Apparat existierenden Luft bestimmen.

Stellen wir uns nun vor, dafs in den Apparat irgendwelches Materialstück eingeführt wird; unter diesen Umständen wird also dann ein Teil der vorher daselbst bestehenden Luft von der Materie des Körpers eingenommen, während die in den Poren einge-

schlossene Luft den Druckveränderungen der den Körper umgebenden Luft folgt. Bezeichnen wir mit $V'$ das neue, in diesem 2. Falle im Apparate vorhandene Luftvolumen, stellen wir uns vor, dafs auch hier das Niveau des Quecksilbers von $AA$ zu $BB$ um ein $v$ gleiches Volumen erniedrigt worden sei, und dafs die neue sich im Innern des Gefäfses bildende Depression in diesem zweiten Falle dagegen $H-h'$ sei, da $h'$ die neue Höhe angibt,

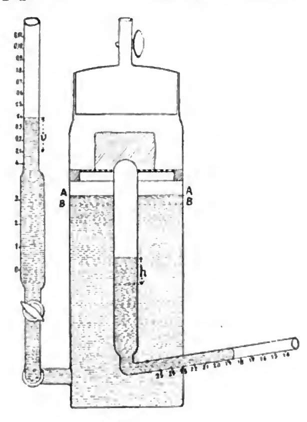



Fig. 2.

auf der die Flüssigkeit im Manometer angelangt, so ergibt sich bei Verwendung des vorhergehenden Verfahrens $V' = v \frac{H-h'}{h'}$ (2). Auch in dieser Formel ist durch den Apparat im zweiten Glied alles bekannt, wodurch also die Berechnung von $V'$, d. h. des in dem Apparat eingeschlossenen Luftvolumens nicht mehr schwer fällt.

Zieht man nun den Unterschied zwischen den beiden Bestimmungen, so erhält man ohne weiteres das Volumen der Materie des in das Gefäfs eingeführten Materials. Stellt man

jedoch den algebraischen Unterschied zwischen den Gleichungen (1) und (2) mit einfachen Umwandlungen fest und verfolgt dann die gegebenen Operationen, so erhält man $V - V'$ = gesuchtes Volumen $= vH \frac{h' - h}{h\,h'}$. (3) Der erste Teil des zweiten Gliedes $vH$ ist eine Quantität, die der Bestimmung zufolge insofern für konstant gehalten werden kann, insofern als sie weder eine Konsequenz des Volumens des eingeführten Materials ist, noch des Niveaus, auf dem zu Anfang der Spiegel des Quecksilbers steht. Nachdem also festgestellt ist, dafs für ein gegebenes Fassungsvermögen des Glasgefäfses eine Senkung um eine bestimmte Anzahl von ccm zweckmäfsig ist, kann die Quantität von $v\,H$ von vornherein in den normalen atmosphärischen Druckverhältnissen sehr nahestehenden Werten von $H$ bemessen werden, und so hat dann der Experimentierende nur das von dem zweiten Teil des zweiten Gliedes in Gleichung (3) gegebene Verhältnis zu entwickeln und es hierauf mit dem Koeffizienten zu multiplizieren, der aus der Tabelle und ihrer Beziehung zu dem im Augenblick der Bestimmung abgelesenen barometrischen Drucke hervorgeht.

Es ist dabei nicht erforderlich, auch der Luftdichtigkeit Rechnung zu tragen, da die Bestimmungen so rasch aufeinanderfolgen, dafs die Veränderungen der Dichtigkeit und des Druckes von den gewöhnlich hierzu gebrauchten Apparaten überhaupt nicht wahrgenommen werden können. Wollte man diese Luftdichtigkeit dann aber auch wirklich in Anrechnung bringen, so wäre ihr Einflufs als ein in die Berechnung einzubegreifender Korrektionskoeffizient doch nur sehr unbedeutend.

Nur für den Fall, dafs in verschiedenen, voneinander getrennten Zeitabschnitten experimentiert werden müfste, mufs auch Temperatur und Barometerdruck in Rechnung gestellt und somit die bekannte Formel $V_0 = V \frac{H - e}{760\,(1 + 0{,}00367\,t)}$ (4) angewandt werden, bei der $H$ die am Barometer abgelesene Pression, $t$ die Temperatur der Luft, $e$ die Spannung des in der Atmosphäre bestehenden Wasserdampfes zum Ausdruck bringt. Alle diese

Daten sind natürlich im Augenblick der Bestimmung abgenommen.

Auf diese Weise erhält man $V_0$, d. h. das in dem Apparat vorhandene Gewichtsvolumen in seiner Beziehung zu normalem Drucke und Temperatur von 0°. Führt man dann in die Gleichung (4) die Temperatur und den Druck der zweiten Lesung ein, und entwickelt, so erhält man $V_0'$, und zieht man dann den Unter-

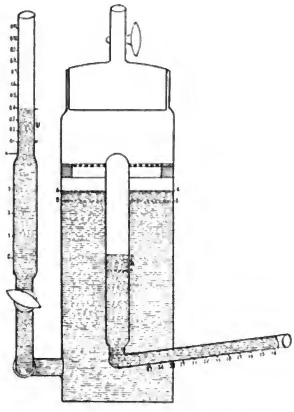


Fig. 3.

schied zwischen $V_0$ und $V_0'$, so kann man das gesuchte absolute Volumen bestimmen.

Auch in diesem besonderen Falle müssen die Bedingungen des Apparats dieselben bleiben wie vorbesagt, da die Korrektion nur an den nach beendeter Operation jeweils erhaltenen Volumen vorgenommen werden kann.

Bis hierher habe ich die Technik vorgeführt, die zu verfolgen ist, wenn man mit dem Apparat derart experimentieren will, dafs bei den nachfolgenden Experimenten das Volumen $v$ des entzogenen Quecksilbers konstant ist. Nun kann man aber

auch, wie ich schon eingangs erwähnt habe, die graduierte Bürette in einer Weise verwenden, dafs man, ohne sich weiter um das dem Glase entnommene Quecksilbervolumen zu kümmern, bei den beiden aufeinanderfolgenden Bestimmungen eine Druckständigkeit in der in dem Apparat eingeschlossenen Luft erhält. Dazu kann man kommen, wenn man Vorsorge trifft, dafs für jede Bestimmung die Manometerflüssigkeit in dem auf der Vorderseite des Gefäfses laufenden, graduierten und inklinierten Arme dasselbe Niveau erreicht.

Gibt man also, denn auch in diesem Falle bestehen vorbesprochene Verhältnisse, den Symbolen den vorbesagten Wert, so erhält man bei der ersten Lesung $V = v \frac{H - h}{h}$ (5) während sich dagegen bei der zweiten Lesung, d. h. wenn im Apparate das Materialstück eingeführt ist, dessen absolutes Volumen man bestimmen will, bei Aufrechterhaltung des vorstehenden Wertes der bei (2) gegebenen Symbole $V' = v' \frac{H - h}{h}$ (6) ergibt, eine Gleichung, bei der $v'$ das Quecksilbervolumen darstellt, das dem Gefäfs entzogen werden mufste, damit der Druck in dem Manometer dieselben Verhältnisse vorfand wie bei der ersten Bestimmung, und unzweifelhaft insofern verschieden sein mufste, als bei dem zweiten Experiment das eine gewisse Luftmasse einnehmende Materialstück vorhanden ist.

Will man dann das Volumen der Materie erhalten, so genügt es auch in diesem Falle gliedweise die Differenz zwischen (5) und (6) zu ziehen. Entwickelt man dann die angegebene algebraische Berechnung und vereinfacht den erhaltenen Ausdruck, so erhält man $V - V' =$ gesuchtes Volumen $= (v - v') \left(\frac{H - h}{h}\right)$ (7).

In diesem Falle kann der zweite Faktor des zweiten Gliedes der Gleichung insofern für eine konstante Quantität gehalten werden, als er in Abhängigkeit von dem Umfang des Apparats innerhalb der Grenzen der Variationen des gewöhnlichen barometrischen Druckes wird berechnet werden können. Dabei versteht es sich von selbst, dafs die Tabellen von dem Umfange

des Apparats abhängen müssen, da die Empfindlichkeit des Manometers doch ganz natürlicherweise je nach dem Durchmesser und der Höhe des Gefäfses verschieden ist.

Aufserdem werden die Tabellen dann aber auch von der Dichtigkeit des im Manometer verwendeten Liquids abhängen, das am besten das Wasser sein wird, in besonderen Fällen aber und bei sehr empfindlichen Apparaten auch durch eine andere weniger dichte Flüssigkeit ersetzt werden kann. In diesem Falle wird dann natürlich auch der Wert des $h$ je nach dem angewandten Mittel variieren.

Die Gesamtheit der zur Bestimmung und Präparation der den Korrektionskoeffizienten des Apparats bestimmenden Tabellen verlangten technischen Erfordernisse spricht, von ganz besonderen Fällen abgesehen, auch vom technischen Standpunkte aus zugunsten der ersten Experimentierungsmethode und also zugunsten der Formel (3) zur Verwendung der den Wert von $vH$ gebenden Tabellen, der Entwicklung der im zweiten Faktor angezeigten Berechnung unter Benutzung der am Manometer erhaltenen Ablesungen.

Es steht aufser Zweifel, dafs mit der Gleichung (7) die durch den Experimentierenden noch auszuführenden Berechnungen weit einfacher sind als die zu Formel (3) erforderlichen. Fafst man aber auch alle Umständlichkeiten und Anforderungen zum Erhalt leicht verwendbarer Tabellen zusammen, so glaube ich, dafs auch da bei sonst gleichen Verhältnissen das erste Vorgehen viel genauer ist als das zweite, während doch schliefslich die vermehrte Berechnung eine ganz relative Sache ist, und anderseits die Quantität der technischen Vornahmen der aufeinanderfolgenden Bestimmungen bei diesen zwei Methoden dieselbe ist.

Es ist dann leicht einzusehen, dafs was im vorigen über die Dichtigkeit der Luft bei nicht unmittelbar nacheinander ausgeführten Bestimmungen gesagt worden ist, auch für diese zweite Methode gilt; die Korrektion aber ist da bei den nachfolgenden Operationen überflüssig. Die genaue Anwendung der Formel verlangt ferner, da der barometrische Druck in Quecksilbersäulen

bewertet worden ist, eine Umrechnung der Manometerlesung in Flüssigkeitssäulen gleicher Dichtigkeit. Zu diesem Zwecke dividiert man die Anzahl der an der Einteilung der Kapillarröhre abgelesenen Millimeter direkt durch das spezifische Gewicht des Quecksilbers, zieht dabei auch die Temperatur in Betracht, in der man arbeitet und nimmt die ihr entsprechende Korrektion vor. Hierzu kann man sich der in den Lehrbüchern für Physik gegebenen Tabellen bedienen, und so darf dann die Korrektion keine bemerkenswerten Schwierigkeiten mehr bieten. Doch auch aus diesem Grunde ist die erste Methode immer wieder vorzuziehen im Hinblick auf den Gebrauch des Apparats, da bei der zweiten Methode zur Vermeidung zu grofser Umständlichkeit in der Fassung der Tabellen die Konstante von Fall zu Fall korrigiert werden mufs, während die Quantität *v*, das aus dem Apparat mit Hilfe der graduierten Bürette entfernte Volumen Quecksilber, durch die Temperaturschwankungen nur ganz unbedeutende Volumenveränderungen erleidet.

Will man die Berechnung nicht äufserst verwickelt gestalten, so ist angesichts der Notwendigkeit dieser Korrektion als normale Manometerflüssigkeit in normalen Fällen am besten das Wasser anzuraten, um so mehr als die Empfindlichkeit der Bestimmungen auch im Vergleich zu den anderen Fehlern, die bei den Bestimmungen begangen werden, durch die Notwendigkeit der Verwendung des Barometers, der bei den gewöhnlichen Instrumenten eine Lesung über $^1/_{10}$ mm nicht gestattet, vollauf genügend ist.

Zur Manometerablesung ist der Apparat derart konstruiert, dafs einer Verschiebung im vertikalen Arme des Manometers um eine gegebene Quantität eine 100mal so grofse Verschiebung im inklinierten entspricht.

Wie bereits bei der Beschreibung der Vorrichtung erwähnt wurde, hat der vertikale Manometer einen innern Durchmesser von 10 mm, die Kapillarröhre dagegen nur 1 mm Durchmesser. Dem physikalischen Gesetz zufolge wirkt der Druck immer in derselben Weise ein, gleichviel welches auch immer die beeinflufste Flüssigkeitsoberfläche sein mag.

Sobald das Glasgefäfs des Apparats vermittelst des oberen Hahnes mit der Atmosphäre in Verbindung steht, sind die beiden Arme des Manometers demselben Drucke ausgesetzt und die Manometerflüssigkeit steht dann in beiden auf derselben Höhe. Ist besagter Hahn dagegen geschlossen, und wird in der im Apparat eingeschlossenen Luft eine Druckveränderung wahrgenommen, so wird die Manometerflüssigkeit zu einer Art Ventil und wird erst dann ihre Gleichgewichtsstellung einnehmen, wenn die Flüssigkeitssäule im vertikalen Arm im Gleichgewichte steht zu dem auf die Kapillarröhre einwirkenden Aufsendruck.

Die Flüssigkeitskolonne im vertikalen Arm nimmt also zu, infolge des Unterschiedes im Durchmesser der beiden kommunizierenden Röhren entspricht nun aber jeder Zunahme der vertikalen Kolonne in der Manometerröhre um 1 mm ein Zurückgehen der Flüssigkeit um 100 mm in der Kapillarröhre.

Will man sich davon einen klaren Begriff machen, so genügt es, den Flächenraum der beiden Röhren zu berechnen, die betragen:

$$^1/_4\ 3.142 \times 10^2 = 78{,}55\ \text{mm}^2 \text{ und } ^1/_4\ 3.142 \times 1^2 = 0{,}7855\ \text{mm}^2.$$

Will man also in der Röhre mit gröfserem Diameter eine Vermehrung um 1 mm erhalten, so mufs die Flüssigkeitskolonne in der Kapillarröhre eine Strecke von 100 mm durchlaufen, denn einem jeden Millimeter entspricht ein in die gröfsere Manometerröhre eingetretenes Flüssigkeitsvolumen von Millimeter 0,7855.

Nach dem bis dahin Gesagten leuchtet es ein, dafs die Empfindlichkeit des Apparates immer die gleiche ist, welches auch immer der durch die beiden Manometerröhren gebildete Winkel sein mag; mit andern Worten kann bei diesem Apparat der Sinus des durch die beiden Arme gebildeten Winkels übergangen werden, was bei dem Recknagelschen Manometer nicht der Fall ist. Die einzige Korrektion, der hier bei der Entwicklung der Berechnungen gedacht werden mufs, ist die aus der Diameterverschiedenheit der beiden Röhren entspringende. Diese Korrektion ist aber bei jedem einzelnen Apparat eine besondere und mufs von dem Erbauer des Apparats jedesmal angegeben werden.

Einmal festgesetzt, braucht diese Korrektion später weder nachgeprüft noch von neuem korrigiert zu werden, weil kein Grund vorhanden ist, der zu dem Gedanken berechtigte, dafs diese Konstante des Apparats irgend welche Veränderungen erleiden könne.

Damit bleibt dann auch gleichzeitig festgestellt, dafs mit der besonderen, den beiden Manometerröhren gegebenen Lage man die Lesung der Empfindlichkeit auf $^1/_{100}$ mm Flüssigkeitskolonne erhält, da die Länge eines Millimeters immer ohne weitere Kunstgriffe wahrgenommen werden kann. Es sei dem noch beigefügt, dafs der Experimentierende mit dem Apparate arbeitend stets darauf achten soll, dafs Verschiebungen um einige Zentimeter vorgenommen werden, da man auf diese Weise ein hinreichend weites Feld zur Lesung von Quantitäten erhält, die nach Umrechnung in vertikale Kolonnen noch wahrnehmbar sind; es wird also die Lesung eines Millimeters in Wirklichkeit niemals vorkommen.

Was dann die graduierte Bürette anbetrifft, so ist da der Fehler, der durch irrtümliche Lesung oder andere Ursachen entstehen könnte, auch nur sehr gering und kann dem vorhin vorgebrachten zur Seite gestellt werden.

Nehmen wir in der Tat an, dafs ein Fehler von einem halben Hundertstel Kubikzentimeter vorgekommen ist, d. h. 5 cmm, eine bei dem Durchmesser absolut wahrnehmbare Quantität, und es ergibt sich folgendes: der Durchmesser des Gefäfses ist, wie gesagt, 5 cm, also mufs der Flächenraum sein:

$$^1/_4\ 3{,}142 \times 5^2 = 19{,}63\ \text{cm}^2 = 1963\ \text{mm}^2.$$

Soll also im Quecksilberspiegel des Gefäfses eine Verschiebung von 1 mm eintreten, so sind dazu 1963 mm³ Flüssigkeit erforderlich. Da nun aber in der Bürette die Lesung noch jenseits der 5 cmm stattfinden kann, so ist der Fehler, der bei dem aufeinanderfolgenden Zurückbringen des Quecksilbers auf denselben Stand begangen werden kann, weit unter einem Hundertstel Millimeter, eine im Vergleich zum Fassungsvermögen des Gefäfses absolut nichtssagende Quantität. Zu bedenken ist dabei schliefslich auch, dafs mit dem Anwachsen des inneren Durch-

messers des Gefäfses dieser Fehler dann sehr rasch verschwindet, was also auch in vorteilhafter Weise gestattet, gröfsere Materialmassen zur Untersuchung heranzuziehen, ohne dafs dadurch Fehler in der Bestimmung entstehen.

Als Schlufs des Auseinandergesetzten sei hier noch gesagt, dafs ich bei Verwendung von Wasser als Manometerflüssigkeit äufserst empfindliche Verschiebungen (40—50 mm im inklinierten Manometerarm) erhalten habe bei Quecksilberentziehungen von nur 1—2 Zehntel-Kubikzentimeter. Wie ich bereits gesagt, sind bei einer solchen Entnahme die Differenzen im innern Niveau des Quecksilberspiegels absolut minimale, was die Empfindlichkeit des ganzen Apparats dartut.

Ein Fehler in der Bestimmung kann nur durch selbst kleine, in den unzugänglichen Höhlungen des in Probe stehenden Materials eingeschlossene Luftmassen, die während der Bestimmung nicht in Aktion treten, hervorgerufen werden.

Dieser Fall kann aber meiner Ansicht nach bei künstlichem Baumaterial nicht so leicht eintreten, da seine Bestandteile hinreichend homogen und nach jeder Richtung hin porös sind, also auch von vornherein das Bestehen solcher Höhlungen ausgeschlossen werden könnte. Dasselbe liefse sich auch über das aus verschiedenen Mineralien zusammengesetzte Material sagen. Dieser Fehler läfst sich aber ebenfalls leicht umgehen, wenn man sich der Vorsicht bedient, zuerst das ganze und dann das gestückelte Material zu bestimmen. Dafs das Material, welches wirklich solche Höhlungen aufweist, solche auch noch nach der Zerstückelung aufweisen kann, ist nur schwer glaublich und fast unannehmbar.

Will man aber selbst zugeben, dafs diese Fehlerquelle sich wirklich bieten kann, so wird ihr Produkt doch mit der von mir vorgeschlagenen Methode immer weniger fühlbar und weniger leicht möglich sein, als wenn man das Material einfach ins Wasser legt und dann mit Hilfe der Gewichtsabnahme des eingesogenen Wassers das Volumen des Körpers durch Abzug des Wasserquantitativs der Poren feststellen will, wie das bei anderen Verfahren der Fall ist.

Ich versuchte es sodann, mit dem Apparat auch die Porosität der Erd- oder Zementmassen zu bestimmen und war mit dem Ergebnis zufrieden. Bei solchen Untersuchungen wird in das Glasgefäfs ein zylinderförmiges Stück des zu prüfenden Materials in einer kleinen Zinkblechröhre ohne Deckel eingeführt und dann die Bestimmung, wie vorbeschrieben, vorgenommen.

Das Probestück kann direkt dem Terrain oder einem Flüggeschen Zylinder entnommen werden, wobei es die Merkmale des zu prüfenden Bodens beibehält.

Nach dem Vorgesagten und auf Grund zahlreicher direkt mit Materialien verschiedenster Qualität und Struktur angestellter Versuche glaube ich behaupten zu dürfen, dafs mein Apparat gute Resultate liefern kann:

1. Weil er leichte und genaue Bestimmungen gestattet;
2. weil er jedes beliebige Material zu untersuchen imstande ist, sei es nun kompakt, bröckelig oder leicht zerfallend;
3. weil zum Erhalt von Bestimmungen keine Präzisionsgewichtsabnahmen nötig sind;
4. weil das zu untersuchende Stück nicht verdorben wird und somit noch zu weiteren Untersuchungen dienen kann.

Dieser letzte Umstand ist ganz besonders von Bedeutung, wenn nach der ersten Untersuchung weitere Vergleichsexperimente mit demselben Material vorgenommen werden sollen.

# Über Agglutination der Meningokokken (Diplococcus intracellularis meningitidis, Weichselbaum).

Von

**Julius Eberle,** diplom. Arzt

aus Schwyz.

(Aus der bakteriologischen Abteilung des Hygiene-Instituts der Universität Zürich. Abteilungsvorstand: Prof. Dr. W. Silberschmidt.)

Im Züricher Hygiene-Institut werden seit einigen Monaten verschiedene Meningokokkenstämme weitergezüchtet. Es wurde mir die Aufgabe übertragen, die Agglutination dieser Stämme, deren Zahl bis zum Abschlusse der Versuche auf 18 angewachsen ist, zu prüfen.

Sämtliche Reinkulturen stammen aus Cerebrospinalflüssigkeit, die fast ausschliefslich intra vitam durch Punktion gewonnen worden war, und zeigen mikroskopisch und kulturell die charakteristischen Eigenschaften der echten Meningokokken.

Die Kolonien auf der Agaroberfläche sind rund, verschieden grofs, zähschleimig, meist scharf begrenzt, weifsgrau, im durchfallenden Lichte mehr bräunlich, durchscheinend, nicht so dicht wie Kolonien von Staphylokokken. Ist viel Material geimpft worden, so sind die einzelnen Kolonien nicht mehr isoliert; sie bilden dann vielmehr einen konfluierenden, feuchtglänzenden, deutlich erhabenen Belag mit Unebenheiten, welche einzelnen Kolonien entsprechen.

Basische Anilinfarben färben die Kokken ungleichmäfsig. Im Vergleich zu den direkten Ausstrichen aus der Cerebrospinalflüssigkeit ist der Pleomorphismus ziemlich ausgesprochen.

Die Kokken sind auch in Kulturen meistens zu zweien angeordnet, die Semmelform ist nicht immer deutlich ausgesprochen, und die Gröfse der Einzelkokken ist sehr variabel. Neben der Diplo- findet sich sehr häufig die Tetradenanordnung, dagegen niemals Kettenbildung.

Nach der Gramschen Methode entfärben sie sich leicht, sie sind also deutlich Gram-negativ und nehmen bei der Kontrastfärbung mit Ziehlscher Lösung die rote Farbe an.

Die direkten Kulturen wurden anfangs auf 4 proz. Glyzerinagar durch Impfung mit viel Eiter, später auf Ascites- oder Blutagar, in einigen Fällen auch in Bouillon oder auf Blutserum angelegt. Wie dies von andern Autoren übereinstimmend angegeben worden ist, konnten auch wir beobachten, dafs die Züchtung der Meningokokken am sichersten und schnellsten auf Ascitesagar gelingt. Auch sind einige Kulturen auf Blutagar gut angegangen. Die direkte Züchtung auf Glyzerinagar gelingt nur, wenn ziemlich viel Material, und zwar speziell Fibrin und Eiter auf den Nährboden gebracht wird, dann kann man beobachten, dafs am zweiten oder dritten Tage nach der Übertragung im Fibrin oder Eiter kleine Kolonien von Meningokokken entstehen. Die zweite Generation auf Glyzerinagar gelang nicht regelmäfsig; die einzelnen Stämme erwiesen sich diesbezüglich verschieden empfindlich. Währenddem die einen leicht angingen, war bei andern ein drei-, vier- oder fünfmaliges Überimpfen auf Ascitesagar erforderlich, bis die Züchtung auf Glyzerinagar gelang. In einem Fall (Stamm Fr.) gelang auch nach wiederholter Übertragung auf Ascitesagar die Weiterzüchtung auf Glyzerinagar nicht, so dafs dieser Stamm stets auf Ascitesagar angelegt und so zu unsern Versuchen verwendet werden mufste. Die Weiterzüchtung erfolgte sonst ausschliefslich auf 4 proz. Glyzerinagar, und zwar wurde die Überimpfung auf neue Nährböden jeden 10. bis 12. Tag vorgenommen. Wenn sich nach einer oder mehreren Generationen auf Glyzerinagar schwaches Wachstum einstellte, wurde der Stamm wiederum auf Ascitesagar überimpft, was neuerdings kräftiges Wachstum zur Folge hatte.

Die einzelnen Meningokokkenstämme wurden der Reihe nach mit verschiedenen Seren auf ihre Agglutinationsfähigkeit geprüft; sie gruppieren sich ihrem Alter nach, von dem ältesten zum jüngsten aufsteigend, wie folgt:

| Bezeichnung der Stammkultur | I. Kultur | | Ungefähre Anzahl der Generationen z. Z. der Versuche |
|---|---|---|---|
| | Anlage | Wachstum | |
| 1. Bäch. | 1. II. 06 | ? | 42 u. 46 |
| 2. Me. | anfangs II. 06 | ? | 45 |
| 3. Does. | 9. III. 06 | 11. III. 06 | 41 |
| 4. Br. | 30. III. 06 | 31. III. 06 | 37 u. 38 |
| 5. Schü. | 11. IV. 06 | 12. IV. 06 | 32 u. 34 |
| 6. We. | 22. IV. 06 | 25. IV. 06 | 36 u. 38 |
| 7. Schr. | 4. V. 06 | 5. V. 06 | 25 u. 31 |
| 8. Ob. | 13. V. 06 | 15. V. 06 | 35 |
| 9. Bam. | 16. V. 06 | 17. V. 06 | 26—37 |
| 10. Fa. | 22. V. 06 | 24. V. 06 | 29 |
| 11. So. | 20. X. 06 | 23. X. 06 | 13—17 |
| 12. Wz. | 4. II. 07 | 6. II. 07 | 3—8 |
| 13. Scha. | 21. II. 07 | 22. II. 07 | 3 u. 5 |
| 14. Str. | 5. III. 07 | 6. III. 07 | 3 |
| 15. Mil. | 26. III. 07 | 27. III. 07 | 3 u. 4 |
| 16. Fr. | 15. IV. 07 | 16. IV. 07 | 4 u. 6 |
| 17. Schra. | 16. IV. 07 | 17. IV. 07 | 3 u. 4 |
| 18. Bet. | 21. V. 07 | 22. V. 07 | 2 |

Zu den Agglutinationsversuchen mit den eben aufgeführten Stämmen verwendeten wir verschiedene Meningokokken-Pferdesera, sowie Sera von Kaninchen, welche durch wiederholte Injektionen eines einzelnen Meningokokkenstammes vorbehandelt worden waren. Auch hatten wir Gelegenheit, Sera von zwei an Cerebrospinalmeningitis erkrankten Menschen zu prüfen.

Daneben wurden vergleichende Untersuchungen angestellt mit anderen Antisera und mit Normalsera.

Es seien hier die verschiedenen verwendeten Sera der Reihe nach aufgezählt.

### A. Normalsera von gesunden Tieren.

1. Pferdeserum, aus der vena jugularis steril entnommen;
2. Kaninchenserum, aus einer Ohrvene aufgefangen;
3. Menschenserum, aus menschlichem Placentarblut gewonnen.

### B. Verschiedene Meningokokkensera.

I. Pferdesera.

4. a) Meningokokkenserum Bern
   Titer 1 : 3000 Ambozeptoren 0,0005,
   b) Genickstarreserum Bern, welches ausschliefslich zu Heilzwecken verwendet wird.
5. Meningokokkenserum Berlin
   Titer 1 : 2000.
6. Meningokokkenserum Merck in zwei Sendungen, ohne Angabe des Titers.

Diese verschiedenen Sera wurden uns in zuvorkommender Weise aus dem Serum und Impfinstitut in Bern (Prof. Dr. Kolle) zur Verfügung gestellt. Ebenso haben wir vom Institut für Infektionskrankheiten in Berlin durch Vermittelung von Herrn Geh.-Rat Prof. Dr. Wassermann ein Meningokokkenserum erhalten, ferner von der Firma Merck in Darmstadt zwei weitere Sera.

II. Kaninchensera.

7. Serum von Kaninchen I, welches in 10 tägigen bis 3 wöchentlichen Intervallen mit 24 stündigen lebenden Kulturen des Stammes So. subkutan geimpft wurde und nach 2 Monaten mit dem homologen Stamm einen Agglutinationstiter von 1 : 200 zeigte.
8. Blutserum von Kaninchen II, welches in gleicher Weise wie Kaninchen I mit Stamm Schr. behandelt wurde und nach 2 Monaten den homologen Stamm in einer Verdünnung von 1 : 100 agglutinierte.

III. Menschensera.

9. Blutserum von Patient Scha., von dem nach glücklich überstandener Meningokokkenmeningitis das Blut steril aus der Armvene entnommen worden war. Der Patient hatte zwei Injektionen von Berner Meningokokkenserum zu je 10 ccm erhalten.

Das Blut wurde mir von meinem Freunde Dr. Spitzer zugeschickt.

10. Blutserum von Patient Str., dem ebenfalls nach der Genesung von der Meningokokkenmeningitis Blut entzogen wurde, welches mir Frl. Dr. Müller zur Verfügung stellte. Dieser Patient hatte keine Meningokokken-Seruminjektion erhalten.

Zu Vergleichszwecken wurden noch folgende Sera verwendet, welche uns ebenfalls vom Berner Impfinstitut freundlichst zugestellt wurden:

## C. Andere Antisera.

11. Antitetanus-Serum,
12. Antistreptococcen-Serum,
13. Antidiphtherie-Serum.

Unsere Untersuchungen wurden vorgenommen, um festzustellen, ob die Agglutination der Meningokokken, welche von vielen Autoren für die Diagnose und Differentialdiagnose dieser Mikroorganismen als ausschlaggebend bezeichnet wird, einen praktischen Wert besitzt.

Die Agglutination hat in den letzten Jahren zur Erkennung und zur Differenzierung einer grofsen Anzahl von Mikroorganismen Bedeutendes beigetragen. Auch für die Diagnose der Meningokokken ist diese Reaktion von vielen Seiten empfohlen worden. Bei der Wichtigkeit der Frage und bei der Schwierigkeit, die Meningokokken von anderen Bakterien mittels der üblichen Methoden zu unterscheiden, erschien es uns angezeigt, die uns zur Verfügung stehenden Stämme in bezug auf ihre Agglutinationsfähigkeit einer eingehenden Prüfung zu unterziehen.

## Anordnung der Versuche.

Die Agglutination wird makroskopisch und mikroskopisch vorgenommen.

Die mikroskopische Agglutination ist besonders geeignet für Bakterien, welche Eigenbewegung aufweisen. Die unbeweglichen Meningokokken lassen sich im hängenden Tropfen schwer prüfen, weshalb für solche Bakterien die makroskopische Reaktion vorzuziehen ist. Letztere Methode wurde übrigens von den meisten Autoren, welche sich bis jetzt mit der Agglutination der Meningokokken befafst haben, angewendet.

### Herstellung der Aufschwemmung.

Wir haben stets eine gröfsere Anzahl von Versuchen gleichzeitig ausgeführt. Es lag uns daran, für ein und dieselbe Versuchsreihe dieselbe Aufschwemmung zu verwenden. Wir bedienten uns daher fertiger (v. Lingelsheim)[1]) Aufschwemmungen, die mit Karbolsäure versetzt wurden; an Stelle von Karbolsäure verwendete v. Lingelsheim Formol.

Die Kulturen wurden in grofsen Rouxschen Flaschen von ca. 21 cm Länge, 11 cm Breite und 6 cm Höhe in den meisten Fällen auf 4proz. Glyzerinagar angelegt; nur bei dem einen Stamm Fr., welcher auf Glyzerinagar nicht gewachsen war, wurde Ascitesagar verwendet.

Die Aufschwemmung erfolgte je nach der Üppigkeit des Wachstums nach 24, meist nach 48, in seltenen Fällen nach 72 Stunden; über 3 Tage alte Kulturen wurden nie zu Versuchen verwendet.

Bei Bedarf von weniger Material wurde die zu prüfende Meningokokkenkultur auf einigen Schrägagarröhrchen angelegt und diese Röhrchenkulturen zur Herstellung der Aufschwemmung benutzt.

Das Impfmaterial stammte stets aus frischen Schrägagarkulturen. Es wurden 5—6 Ösen Material in eine Rouxsche Flasche übertragen, welches durch einen im Heifsluftschrank sterilisierten, rechtwinklig gebogenen Glasstab auf der Agarober-

fläche gleichmäfsig verteilt wurde. Vor Herstellung der Aufschwemmung wurden sämtliche Kulturen jeweils auf ihre Reinheit geprüft.

Die Aufschwemmung wurde mit je 10 ccm 0,8 proz. steriler Kochsalzlösung pro Rouxsche Flasche bereitet. Die Kulturen wurden mit dem rechtwinklig gebogenen, sterilen Glasstab von der Agaroberfläche abgestreift, wodurch eine sehr dichte Aufschwemmung entstand. Diese wurde mit einer lang ausgezogenen sterilen Pipette aspiriert und in ein steriles Reagensröhrchen gebracht. Zur Abtötung der Kokken wurden der Aufschwemmung 10 ccm 0,5 proz. Karbolsäurelösung zugesetzt und die Mischung ca. 1 Stunde stehen gelassen.

Dort, wo an Stelle der grofsen Flaschen Oberflächenkulturen auf Schrägagar zur Verwendung gelangten, wurden jedem Röhrchen 2 ccm 0,8 proz. steriler Kochsalzlösung zugesetzt, die Kulturen mit dem ausgeglühten Platindraht von der Oberfläche abgestreift, die so bereiteten Aufschwemmungen in ein gemeinsames, steriles Reagensröhrchen gegossen, mit der der Anzahl Kubikzentimeter Aufschwemmung entsprechenden Menge 0,5 proz. Karbolsäurelösung versetzt und zur Abtötung ebenfalls ca. 1 Stunde stehen gelassen.

Die so bereitete Aufschwemmung ist für Agglutinationszwecke viel zu dicht, sie mufste entsprechend verdünnt werden.

Zur Verdünnung diente 0,8 proz. sterilisierte physiologische Kochsalzlösung und soviel einer 0,5 proz. Karbolsäurelösung bis die fertige Aufschwemmung 0,05 proz. war.

Die Verdünnung wurde in grofsen, ca. 25 cm langen und 3—4 cm breiten Glasgefäfsen von Reagensglasform vorgenommen; in diese im Heifsluftschrank sterilisierten Gefäfse wurde eine gewisse Menge 0,8 proz. steriler Kochsalzlösung und 0,5 proz. Karbolsäurelösung gegossen und so lange von der konzentrierten Aufschwemmung zugesetzt, bis ein bestimmter Grad der Trübung erreicht war.

Um für die Bestimmung der Dichtigkeit der Aufschwemmung ein konstantes Mafs zu haben, wurde in absolutem Alkohol auf-

gelöster Mastix mit destilliertem Wasser so weit verdünnt, dafs die Flüssigkeit im auffallenden Lichte undurchsichtig, im durchfallenden Lichte noch etwas durchscheinend war. Mit dieser Testflüssigkeit wurden die einzelnen Aufschwemmungen verglichen und entsprechend weiter verdünnt.

War die Aufschwemmung so weit hergestellt, so wurde sie entweder nach 12stündigem Stehenlassen oder direkt in im Heifsluftschrank sterilisierte Zentrifugierröhrchen übergeschüttet und ca. 1 Stunde auf einer nicht sehr starken Zentrifuge zentrifugiert.

Die Agglutinationsreaktionen wurden mit der fertigen Aufschwemmung in den meisten Fällen sofort innerhalb 24 Stunden, seltener nach 2—3 Tagen, einmal aus äufseren Gründen nach $5\frac{1}{2}$ Tagen, einmal nach 13 Tagen ausgeführt.

Die einzelnen Autoren, welche sich mit der Agglutinationsreaktion befafst haben, haben verschiedene Methoden angewandt. Die meisten benutzten lebende Kulturen; sehr verbreitet ist die von Kolle angegebene Methode der Aufschwemmung einer Normalöse Agarkultur in 1 ccm Flüssigkeit.

Bettencourt und França[2]) verwendeten 24stündige lebende Bouillonkulturen.

Von Lingelsheim[1]) hat in einigen Versuchen eine der unsrigen ähnliche Methode angewandt mit dem Unterschiede allerdings, dafs er an Stelle der Karbolsäure eine 0,25proz. Formollösung zur Abtötung der Meningokokken benutzte.

Die Gründe der Verwendung abgetöteter Aufschwemmungen für unsere Versuche sind folgende:

Wir wollten eine einfache Methode, die sich bequem und gefahrlos in Laboratorien sowohl wie in Kliniken anwenden liefse, erproben. Ferner war es uns daran gelegen, für eine Versuchsreihe möglichst gleiches Material zu benutzen. Beides liefs sich viel leichter mittels Aufschwemmung grofser Kulturmengen als mittels des zeitraubenden Verfahrens der Aufschwemmung je einer Normalöse pro Röhrchen erreichen.

Der Einwand, daſs durch die Verwendung abgetöteter Kulturen die Agglutinationsfähigkeit beeinträchtigt sei, haben wir anfangs zu widerlegen versucht, indem wir beobachteten, daſs Aufschwemmungen mit lebenden Kulturen nicht bessere Resultate ergaben.

Der Zusatz einer ziemlich groſsen Menge Karbolsäurelösung war geboten, um die Versuchsergebnisse nicht durch nachträgliche, während der Aufbewahrung auftretende Infektionen zu trüben. Die Möglichkeit, daſs bei einer andern Art der Zubereitung der Aufschwemmung die Meningokokken leichter agglutinabel bleiben, wollen wir zugeben. Uns lag es aber vor allem daran, brauchbare vergleichende Resultate zu erhalten, und dieses Ziel glauben wir erreicht zu haben.

Die fertige Aufschwemmung hat zudem den Vorteil, daſs alle Versuchsröhrchen gleichmäſsig getrübt sind, wodurch allfällig Fehldiagnosen auf beginnende Agglutination vermieden werden können.

Eine Zentrifugierung der Aufschwemmung wurde vorgenommen, um Partikel, die beim Abstreifen der Kultur sich vom Nährboden lösten, oder gröſsere Bakterienkonglomerate als Bodensatz auszuscheiden, um Sedimentierungen durch dieselben in den Versuchsröhrchen vorzubeugen.

Besonders hervorgehoben sei die regelmäſsige Anlegung von Kontrollröhrchen. Bei unsern zahlreichen Versuchen mit Meningokokken ist es sozusagen niemals vorgekommen, daſs die Röhrchen ohne Serumzusatz Pseudo-Agglutination zeigten. Bakterien, wie z. B. Streptokokken, lassen sich nicht so gleichmäſsig aufschwemmen und bleiben auch nicht so lange suspendiert.

Die gebrauchsfertige Aufschwemmung wurde den entsprechenden Serumverdünnungen zugefügt, wie sie im folgenden beschrieben werden.

### Ausführung der Agglutinationsreaktion.

Die Reaktion wurde in Spitzröhrchen ausgeführt von ca. 5 cm Länge und ca. 0,6 cm lichter Weite. Vor jedem Versuche

wurden sie durch halbstündiges Erhitzen auf 150° C im Heifsluftschrank sterilisiert. Zur Auffüllung wurden sie in Blechgestelle gestellt, die ähnlich den von Ficker angegebenen konstruiert, aber für Aufnahme einer gröfseren Anzahl von Röhrchen bestimmt sind.

Zuerst wurde stets das unverdünnte oder verdünnte Serum, darauf die Aufschwemmung in die Röhrchen gebracht. Zur Kontrolle wurde ein Röhrchen pro Versuch nur mit der Aufschwemmung beschickt.

Anfänglich wurden die Meningokokkenseren und die drei anderen Antiseren in Verdünnungen von 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 geprüft; später wurde die Verdünnung 1:10 weggelassen.

In den Versuchen mit Menschennormalserum fingen wir mit der Verdünnung von 1:5 an; mit den übrigen Normalseren bei 1:10, und führten die Versuche mit den gleichen Verdünnungen durch, bis und mit der Verdünnung 1:200.

Serum und Aufschwemmung wurden mit einer schon seit Jahren in unserm Institute für Typhusagglutinationen angewendeten graduierten Pipette abgemessen.

Diese 1 ccm fassende Pipette ist im untersten Teile in $^1/_{100}$ ccm eingetreilt, im oberen Teile, der ein etwas weiteres Lumen hat, sind nur Fünfhundertstel- und $^1/_{10}$-Einteilungen eingetragen.

Für die ersten Röhrchen einer jeden Serie wurde das Serum direkt abgemessen, während die übrigen Röhrchen mit der entsprechenden Menge des in einer sterilen Uhrschale mit 0,8 proz. steriler physiologischer Kochsalzlösung zehnfach verdünnten Serums beschickt wurden.

Der Serumverdünnung wurde die ihr entsprechende Menge der zu untersuchenden Aufschwemmung zugefügt, und zwar, entsprechend den einzelnen Serumverdünnungen, die Aufschwemmungen:

| Verdünnung | Menge des Serums in ccm | Menge der Meningokokken-aufschwemmung in ccm |
|---|---|---|
| 1 : 5 | 0,2 unverdünnt | 0,8 |
| 1 : 10 | 0,1 » | 0,9 |
| 1 : 20 | 0,05 » | 0,95 |
| 1 : 50 | 0,02 » | 1,0 |
| 1 : 100 | 0,1 10fach verdünnt | 1,0 |
| 1 : 200 | 0,05 » » | 1,0 |
| 1 : 500 | 0,02 » » | 1,0 |
| 1 : 1000 | 0,01 » » | 1,0 |

Von Lingelsheim[1]) verwendete zur gründlichen Mischung von Serum und Aufschwemmung 1 ccm fassende, graduierte Mischpipetten; wir benutzten dazu den Platindraht, der auch von dem Kontrollröhrchen und den stärkern zu den schwächern Verdünnungen aufsteigend, ohne inzwischen ausgeglüht zu werden, zur Entfernung der in den Röhrchenspitzen angesammelten Luftblasen dient, da diese die Beobachtung wesentlich stören.

Um die Flüssigkeit vor Verdunstung zu schützen, wurden die Spitzröhrchen mit Korkzapfen fest verschlossen.

Anfänglich machten wir drei parallele Versuchsreihen, die eine bei Zimmertemperatur (16—18° C), die andere bei Bruttemperatur (35—37° C) und eine dritte bei 56—58° C.

Die Versuche bei 56—58° wurden ausgeführt, gestützt auf Mitteilungen verschiedener Autoren, welche bei Anstellung von Agglutinationsversuchen günstigere Resultate bei 50—55° als bei 36° erhalten haben.

Die Versuche bei Zimmertemperatur wurden bald verlassen, nachdem es sich herausgestellt hatte, dafs die Reaktion später, nicht so sicher und in so hohen Verdünnungen eintrat als bei den höheren Temperaturen.

Die Beobachtungen erfolgten ausschliefslich mit unbewaffnetem Auge. Dabei wurden nur diejenigen Fällungen als

Agglutination bezeichnet, welche sich beim Schütteln als feine Flocken aufwirbeln ließen.

Zu Beginn der Versuche haben wir die Reaktion schon nach 2 Stunden kontrolliert; bald stellte es sich aber heraus, daß in dieser kurzen Zeit in keinem einzigen Falle brauchbare Resultate zu erhalten waren, so daß wir erst am folgenden Tag, d. h. 15—23 Stunden nach Anlegung des Versuches, die ersten Resultate notierten. Die Röhrchen wurden dann täglich zweimal kontrolliert, anfänglich 3—4 Tage lang; später, als es sich herausstellte, daß die Reaktion nach 48 Stunden ziemlich konstant blieb, wurden die Röhrchen nur 2 Tage lang beobachtet. Die Versuche wurden meistens in der Weise angestellt, daß jeder einzelne Meningococcenstamm mit den verschiedenen zu prüfenden Seren gleichzeitig vermengt wurde.

Als Beispiel sei hier die Agglutination des Stammes Dös. mit den verschiedenen Seren angeführt.

**Agglutination des Stammes Dös. mit den verschiedenen Seren.**

| Serum | Verdünnung | bei 37° Resultat nach Stunden | | bei 56° Resultat nach Stunden | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 22 | 48 | 22 | 48 |
| Pferde-Normalserum . . | 1 : 20 | + | + | + | + |
| | 1 : 50 | — | ? | — | — |
| | 1 : 100 | — | — | — | — |
| | 1 : 200 | — | — | — | — |
| Menschen-Normalserum | 1 : 5 | — | □ | — | + |
| | 1 : 10 | — | □ | — | — |
| | 1 : 20 | — | — | — | — |
| | 1 : 50 | — | — | — | — |
| | 1 : 100 | — | — | — | — |
| | 1 : 200 | — | — | — | — |
| Kaninchen-Normalser. . | 1 : 20 | — | + | — | — |
| | 1 : 50 | — | ? | — | — |
| | 1 : 100 | — | — | — | — |
| | 1 : 200 | — | — | | — |

Kontrollröhrchen bei 37° und 56° negativ.

Agglutination des Stammes Dös. mit den verschiedenen Seren.

| Serum | Verdünnung | bei 37° Resultat nach Stunden | | bei 56° Resultat nach Stunden | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 22 | 48 | 22 | 48 |
| Ser. von Kaninchen I | 1:20 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 1:50 | +++ | +++ | ++ | +++ |
| | 1:100 | + | ++ | ++ | ++ |
| | 1:200 | — | — | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Ser. von Kaninchen II | 1:20 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 1:50 | — | +++ | +++ | +++ |
| | 1:100 | — | +++ | + | +++ |
| | 1:200 | — | — | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Serum Bern . . . . | 1:20 | +++ | +++ | ++ | ++ |
| | 1:50 | +++ | +++ | — | + |
| | 1:100 | + | +++ | — | + |
| | 1:200 | — | ? | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Serum Berlin . . . | 1:20 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 1:50 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 1:100 | +++ | +++ | ++ | ++ |
| | 1:200 | — | — | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Diphtherie-Serum etc. | 1:20 | ++ | +++ | ++ | ++ |
| | 1:50 | + | +++ | + | + |

Kontrollröhrchen bei 37° und 56° negativ.

Zu den Tabellen bedienten wir uns folgender Zeichen:

+++ = starker Bodensatz mit vollständig aufgehellter Aufschwemmung.

++ = starker Bodensatz mit unvollständig aufgehellter Aufschwemmung oder starke Flockenbildung mit vollständig aufgehellter Aufschwemmung.

+ = deutlicher Bodensatz oder Wandbelag.

□ = Spur von Agglutination.

? = Es kann nicht entschieden werden, ob Agglutination oder Sediment der Aufschwemmung vorliegt.

— = Keine Agglutination.

Wegen einer besseren Übersicht wollen wir unsere Resultate nicht nach den einzelnen Stämmen, sondern nach den einzelnen Seren geordnet, zusammenstellen.

Es sei noch besonders hervorgehoben, dafs die einzelnen Versuche meistens wiederholt wurden. Fielen die Versuche oder einzelne Reaktionen mit den ersten Resultaten nicht übereinstimmend aus, so wurden sie zum dritten oder sogar zum vierten Male nachgeprüft.

## I. Agglutinationsversuche mit verschiedenen Meningokokkenseren.

Die Resultate werden nach den einzelnen zur Verwendung gekommenen Seren angeführt. Die einzelnen Serumproben wurden während der Versuchszeit im Dunkeln und bei niedrigen Temperaturen (im Eisschrank) aufbewahrt. Grofse Unterschiede liefsen sich zwischen dem Beginn und dem Schlusse unserer Untersuchungen bei einigen Vergleichsprüfungen nicht nachweisen.

### A. Versuche mit Meningokokken-Pferdeseren.

#### 1. Versuche mit Berner Serum.

Aus Tabelle I, Seite 206, ist ersichtlich, dafs sämtliche Meningokokkenstämme vom Berner Serum agglutiniert worden sind. Ausschlaggebend für die Beurteilung der Resultate ist aber nur die Agglutination in höheren Verdünnungen. In dieser Beziehung lassen unsere Resultate zu wünschen übrig. Von 18 geprüften Stämmen ist der Unterschied im Verhalten der einzelnen Stämme sehr grofs. Während z. B. Bam. und Schr. in Verdünnungen von 1 : 1000 noch deutlich agglutiniert wurden, war dies bei We. und Fr. bei einer Verdünnung von 1:50 kaum der Fall.

Fassen wir die Resultate unserer Untersuchungen mit Berner Serum zusammen, so würden sie lauten:

Die Agglutination wurde bei sämtlichen 18 geprüften Stämmen beobachtet; davon zeigten 2 Stämme Agglutination bis zur Verdünnung von 1 : 1000; 3 bis 1 : 500; 8 bis 1 : 200;

3 bis 1 : 100. Ein Stamm agglutinierte deutlich bis 1 : 50, ein anderer schwach bis 1 : 50.

Von den geprüften 18 Stämmen wiesen 11 Stämme bei 56—58° C bessere, 7 schlechtere Resultate auf als bei 37°.

Unter diesen 7 Stämmen ist das Resultat des Stammes Schra. am auffälligsten, da dieser bei Bruttemperatur bis auf 1 : 200 agglutiniert wurde, während bei 56—58° die Reaktion schon bei 1 : 20 nicht deutlich positiv war, was durch wiederholte Prüfung bestätigt wurde.

Die besten Resultate bei 56° beziehen sich ausschliefslich auf Stämme, die auch bei Bruttemperatur günstige Resultate aufwiesen.

Das Maximum der Reaktion war bei 56° meist schon am ersten Tage erreicht, während es bei 37° erst am zweiten Tage eintrat.

## 2. Versuche mit Berliner Serum.

Die Betrachtung der Tabelle II, Seite 207, ergibt, dafs das Meningokokkenserum Berlin sämtliche Meningokokkenstämme agglutinierte. Die individuellen und graduellen Unterschiede der Agglutinabilität sind nicht so grofs wie bei der Agglutination mit Berner Serum.

Nur ein Stamm wurde bis zur Verdünnung 1 : 1000 agglutiniert, ein anderer schwach bis 1 : 500, die meisten bis 1 : 200 und 1 : 100; einzelne nur bis 1 : 50 und 1 : 20.

Eine Zusammenfassung der Resultate ergibt: das Berliner Meningokokkenserum agglutinierte sämtliche 18 geprüften Meningokokkenstämme, davon einen bis 1 : 1000, einen zweiten bis 1 : 500, 8 bis 1 : 200, 6 bis 1 : 100 und je einen bis 1 : 50 und 1 : 20.

Die Agglutination wies bei 56° im allgemeinen schlechtere Resultate auf wie bei 37°. Eine Ausnahme davon machen die höchst agglutinierten Stämme Ob. & Br., die nicht bei 37°, sondern bei 56° ihre höchsten Werte erreichten.

Das Maximum der Reaktion war bei 37° und 56° fast gleichzeitig aufgetreten.

3. Versuche mit Merckserum. (Zu Tabelle III, Seite 208.)

Die Agglutination war bei sämtlichen 18 geprüften Stämmen positiv. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen schienen hier nicht sehr deutlich ausgesprochen. Die Agglutination in der Verdünnung 1 : 1000 wurde niemals, die Agglutination bis 1 : 500 einmal erreicht. Die meisten Stämme wurden bis 1 : 200 und 1 : 100, einzelne nur bis 1 : 50 und 1 : 20 agglutiniert.

Auffällig ist das Resultat von Wz., der mit Berner und Berliner Serum bis 1 : 200 agglutiniert wurde, während er hier bei 37° nur bis 1 : 20, bei 56° gar nicht reagierte.

Fassen wir die Resultate mit Merckserum zusammen, so ergibt sich folgendes: Das Merckserum agglutinierte alle 18 geprüften Stämme, aber keinen bei der Verdünnung 1 : 1000, einen schwach bis 1 : 500, 10 bis 1 : 200, 4 bis 1 : 100, einen bis 1 : 50, einen undeutlich und einen sehr schwach bis 1 : 20.

Die Resultate sind durchschnittlich bei 56° besser ausgefallen; auch das Maximum der Agglutination wurde bei dieser Temperatur früher erreicht als bei Bruttemperatur.

Der Vergleich der drei Meningokokken-Pferdeseren ergibt, dafs alle drei Meningokokken-Pferdeseren auf die Meningokokkenstämme agglutinierend wirken, dafs aber ihr Wirkungsgrad verschieden ist.

## B. Versuche mit Meningokokken-Kaninchenserum.

Diese Versuche können nicht in gleicher Weise beurteilt werden wie die Versuche mit den Meningokokken-Pferdeseren, weil die Vorbehandlung der Tiere zu Beginn der Versuche noch nicht weit vorgeschritten war.

Es lag auch nicht in unserer Absicht, vergleichende Untersuchungen zwischen Pferde- und Kaninchen-Immunseren anzustellen, sondern zu prüfen, ob ein grofser Unterschied zwischen

der Agglutination des homologen und der übrigen Stämme bestehe.

Vorbehandlung der Tiere. Beide Tiere wurden von Anfang an mit lebenden Kulturen geimpft.

Vor der ersten Injektion wog Kaninchen I = 2200 g, Kaninchen II = 2300 g.

17. XII. 06. Heute wurde beiden Tieren Blut entnommen; das Blutserum agglutinierte Meningokokken nicht.

18. XII. 06. Erste Injektion von 1 ccm einer frisch aufgeschwemmten Agarkultur.

Kaninchen I wurde ausschliefslich mit Stamm So., Kaninchen II ausschliefslich mit Stamm Schr. vorbehandelt.

18. I. 07. Agglutination von Meningokokken mit Serum von Kaninchen I und Kaninchen II negativ.

15. II. 07. Beide Kaninchen hatten vom 18. I. 07 bis heute zwei weitere Injektionen von frischen Kulturen erhalten. Heute Blutentnahme.

16. II. 07. Agglutination von Meningokokken mit Serum von Kaninchen I positiv (s. Tabelle IV, Seite 209).

18. II. 07. Agglutination von Meningokokken mit Serum von Kaninchen II positiv (s. Tabelle V, Seite 210).

2. V. 07. Beide Kaninchen haben bis heute je 7 Injektionen erhalten.

Das Blut wurde jeweils am Tage vor einer neuen Injektion entzogen und in den Eisschrank gestellt. Am folgenden Tage wurde das Serum mit einer sterilen Pipette aspiriert, in sterile Reagensröhrchen gebracht und darin bis zum Gebrauche im Eisschrank aufgehoben.

Die beiden Seren wurden mit dem homologen Stamm und mit allen übrigen Stämmen zu verschiedenen Zeiten geprüft.

Weil den Tieren während der Zeit, wo die Versuche ausgeführt wurden, immer noch Meningokokkenaufschwemmungen injiziert wurden, erachten wir es für zweckmäfsiger, in den folgenden zwei Tabellen die Versuche nicht nach dem Alter der Stämme geordnet, wie bisher, sondern in chronologischer Reihenfolge aufzuführen.

### 1. Versuche mit Meningokokkenserum von Kaninchen I. (Tabelle IV, Seite 209.)

Sämtliche 18 Stämme wurden von dem Meningokokkenserum von Kaninchen I ziemlich gleichmäfsig agglutiniert. Agglutination in den Verdünnungen von 1 : 500 und 1 : 1000 wurde nie erreicht; dagegen agglutinierten 6 Stämme, worunter der homologe Stamm bis 1 : 200, 9 bis 1 : 100, 2 bis 1 : 50 und einer bis 1 : 20.

Wz. und Fr. ergaben die schlechtesten Resultate, während Stamm We., der mit den Pferdeseren schlecht agglutinierte, bis 1 : 100 agglutiniert wurde. Der homologe Stamm So. wurde nach drei Injektionen bis 1 : 200 agglutiniert, nach sieben Injektionen bis 1 : 100; einige andere Stämme erreichten ihn in der Agglutinationshöhe.

Die Zeit zwischen der letzten Injektion und der Blutentnahme betrug ca. anderthalb Monate; das Kaninchen hatte nach der letzten Injektion ziemlich stark reagiert. Diese beiden Momente erklären wahrscheinlich den Unterschied der Resultate.

Die Ergebnisse dieser Versuche lauten: Das Serum des mit der Kultur So. vorbehandelten Kaninchens agglutinierte den homologen Stamm bis 1 : 200; diesen Agglutinationswert erreichten ebenfalls einige andere Stämme.

Die Resultate bei 37° und bei 56° sind ziemlich gleich.

Einzig der Stamm Bet. weist bei 37° ein bedeutend besseres Resultat auf als bei 56°; das Maximum der Reaktion trat bei beiden Temperaturen ungefähr gleichzeitig ein.

### 2. Versuche mit Meningokokken-Serum von Kaninchen II. (Tabelle V, Seite 210.)

Die geprüften 18 Stämme wurden vom Serum von Kaninchen II agglutiniert. Agglutinationen in Verdünnungen von 1 : 1000 und 1 : 500 zeigten sich nicht; dagegen agglutinierten vier Stämme sehr stark, fünf Stämme schwächer, bis 1 : 200, sechs, worunter der homologe Stamm (Schr.) bis 1 : 100, zwei bis 1 : 50, einer bis 1 : 20.

Der homologe Stamm Schr. zeigte zu Beginn und am Ende der Versuche nur Agglutination bis 1 : 100.

Das Resultat dieser Versuche lautet: das Meningokokken-Kaninchenserum Schr. agglutinierte sämtliche 18 geprüften Meningokokkenstämme; dabei wurde der homologe Stamm Schr. bis 1 : 100, andere Stämme bis 1 : 200 agglutiniert.

Die Versuche bei 56° gestalteten sich etwas günstiger wie die bei 37°. Das Maximum der Reaktion trat bei beiden Temperaturen ungefähr gleichzeitig ein.

### C. Versuche mit dem Blutserum von Meningitiskranken.

Tabelle VI u. VII, Seite 211.

Von Patient Str. (Tab. VII) erhielten wir leider zu wenig Blut, um ausgedehnte Untersuchungen anzustellen; aber dennoch konnten wir beobachten, dafs Agglutination bis 1 : 20 am homologen und an einem heterologen Stamme eintrat.

Patient Scha. (Tab. VII) lieferte uns Blutserum genug, um alle 18 Stämme auf Agglutination zu prüfen; die Agglutinationsreaktion aber kann dem Patientenserum allein nicht zugeschrieben werden, da dem Kranken 20 ccm Meningokokkenserum Bern injiziert worden waren.

Die Betrachtung der Tabelle VI ergibt, dafs unter den 18 Stämmen der Stamm Wz. sehr schwach, der Stamm Fr. gar nicht beeinflufst wurde. Von den übrigen Stämmen wurden Bam. bis 1 : 200, fünf Stämme, worunter auch der homologe Stamm Scha., bis 1 : 100, zehn Stämme bis 1 : 50, ein Stamm bis 1 : 20 schwach und ein Stamm gar nicht agglutiniert.

Aus diesen Resultaten folgt: das Meningokokken-Menschenserum Scha. hat auf die Mehrzahl der Meningokokkenstämme agglutinierende Wirkung. Die höchsten Werte sind 1 : 200 und 1 : 100; eine stärkere Agglutination des homologen Stammes Scha. ist nicht nachweisbar.

Die Resultate bei 37° sind günstiger. Das Maximum der Reaktion ist bei beiden Temperaturen ungefähr gleichzeitig erreicht.

## Einfluſs der Temperatur auf die Agglutination.

Von verschiedenen Autoren ist die optimale Temperatur für Prüfungen auf Agglutination nicht übereinstimmend angegeben worden. Aus diesem Grunde haben wir fast alle unsere Versuche bei Bruttemperatur und bei 56—58° C vorgenommen.

Um aber den Einfluſs der Agglutination bei Zimmertemperatur auch in den Bereich unserer Betrachtungen zu ziehen, haben wir mit einer Anzahl von Stämmen gleichzeitig drei Versuchsreihen angestellt. Die Resultate dieser Versuche sind auf Tabelle VIII, Seite 212 und 213, zusammengestellt.

Wir haben schon bei Betrachtung der früheren Tabellen beobachten können, daſs zwischen den Versuchen bei 37° und 56° keine Übereinstimmung besteht. Die einen Stämme wurden besser bei der höheren, die andern besser bei Bruttemperatur von ein und demselben Serum agglutiniert. In keinem einzigen Falle ist aber bei der einen Temperatur die Agglutination vollständig ausgeblieben, während sie bei der andern deutlich war, so daſs es für praktische Zwecke genügen wird, entweder bei 37° oder bei 56° zu agglutinieren.

Die Reaktion schien in vielen Fällen bei 56° etwas früher aufzutreten; aber auch hier herrschte keine Gesetzmäſsigkeit.

Die Agglutination bei Zimmertemperatur erscheint auf Grund unserer Untersuchungen nicht empfehlenswert.

## Versuche mit Chlorkalziumzusatz.

Unsere bisherigen Versuche mit Meningokokkenserum haben ergeben, daſs alle Stämme agglutiniert werden, daſs aber die einen leichter, die anderen schwerer agglutinabel sind. Auffallend ist, daſs der Titer, auch der stärker agglutinierenden Sera, im Verhältnis zu den Befunden anderer Autoren verhältnismäſsig niedrig ist.

Unter den Substanzen, welche die Agglutination verbessern sollen, ist in letzter Zeit Chlorkalzium ($CaCl_2$) empfohlen worden.[1]) Wir versuchten, ob diese Substanz auf die Meningokokkenagglutination einen Einfluſs ausübe.

Wir stellten eine 5 proz. Lösung von Chlorkalzium (kristallisiert, hygroskopisch) in destilliertem Wasser her und setzten von dieser Lösung soviel hinzu, dafs die Aufschwemmung 0,2% Chlorkalzium enthielt. Sie hatte somit, die 0,8 proz. physiologische Kochsalzlösung inbegriffen, einen Salzgehalt von 1,0%.

Es wurde eine Anzahl Parallelversuche mit und ohne Chlorkalziumzusatz ausgeführt, und zwar mit 7 verschiedenen Stämmen und den Seren Merck und Bern, sowie mit den Seren von Kaninchen I und II.

Die Resultate waren wechselnd, bald besser, bald schlechter. Die Unterschiede in der Höhe der Agglutination waren nicht konstant und nicht grofs. Das eine Mal trat in dem Chlorkalziumversuch Agglutination bis 1 : 200, in dem Versuch ohne Chlorkalziumzusatz bis 1 : 100 ein. Ein anderes Mal zeigten sich mit dem gleichen Stamm umgekehrte Werte; nur der Stamm Schra. machte eine Ausnahme davon. Er wurde in der Chlorkalziumaufschwemmung bis 1 : 1000, in der gewöhnlichen nur bis 1 : 100 agglutiniert.

Unsere Resultate gestatten uns nicht, den Chlorkalziumzusatz als sicher wirkendes, die Agglutinationsreaktion verbesserndes Mittel zu bezeichnen.

## Einwirkung des Zentrifugierens auf die Agglutination.

Gaehtgens[5]) empfiehlt zur Beschleunigung und zur Verbesserung der Reaktion die Zentrifugierung der mit Serum vermengten Aufschwemmung und berichtet über günstige Resultate bei der Typhus- und Paratyphusagglutination. Nach seinen Angaben genügt ein 10 Minuten langes Zentrifugieren.

Wir machten einige analoge Versuche mit Meningokokkenaufschwemmung und Meningokokkenserum.

Die Aufschwemmung wurde in üblicher Weise hergestellt und auf der Wasserzentrifuge zentrifugiert, dann aber noch 10 Minuten lang auf einer elektrischen stärkeren Zentrifuge nachzentrifugiert, so dafs alle Partikelchen ausgeschleudert wurden. Sie wurde dann in der gewöhnlichen Weise in den Spitzröhrchen

mit dem Serum zusammengebracht. Die so gefüllten Spitzröhrchen wurden sofort mit einem Kontrollröhrchen, das nur Aufschwemmung enthielt, in die elektrische Zentrifuge (ca. 2500 Touren) gebracht und 10 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurden die Röhrchen untersucht.

Es zeigte sich meist in jedem Röhrchen ein kleiner Bodensatz. Dieser Bodensatz, der auch im Kontrollröhrchen aufgetreten war, konnte nicht als Agglutination, sondern nur als Sediment betrachtet werden. Eine eigentliche Agglutination war nach dem Zentrifugieren nicht zu beobachten.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dafs das Zentrifugieren bei gewöhnlicher Temperatur keine Beschleunigung und Begünstigung der Agglutination der Meningokokken bedingt.

Wir haben schon weiter oben erwähnt, dafs die Agglutination bei Zimmertemperatur nicht, oder nur ganz schwach auftritt; möglicherweise wäre die Zentrifugierung bei höherer Temperatur erfolgreicher.

## II. Agglutination mit nicht spezifischen Seren.

Es ist von den verschiedenen Autoren, welche die Agglutination der Meningokokken untersucht haben, darauf hingewiesen worden, dafs diese Agglutination nicht nur mit spezifischen Seren, sondern auch, allerdings in geringerem Grade, mit Normalseren auftritt.

Für die Beurteilung des Wertes der Agglutination von Meningokokken ist es daher unbedingt erforderlich, andere, nicht spezifische Serumproben zu prüfen.

Zu Parallelversuchen wurden Sera gesunder Menschen und Tiere, ferner verschiedene Antisera verwendet.

1. Versuche mit Normalseren. (Tabelle IX, Seite 214 u. 215.)

Es gelangten Pferde-, Kaninchen- und Menschennormalseren zur Untersuchung. Die Agglutination mit Pferdenormalserum, das für alle Versuche vom gleichen Pferde stammte, wurde an sämtlichen 18 Stämmen geprüft und war überall positiv. In keinem einzigen Falle war die Agglutination bis 1 : 100 deutlich;

dagegen agglutinierten über die Hälfte der Stämme bis 1 : 50, alle übrigen deutlich bis 1 : 20.

Das für die Versuche verwendete Kaninchennormalserum stammte aus dem Blute von zwei verschiedenen Tieren.

Mit Kaninchennormalserum ergaben sich folgende Resultate: drei Stämme agglutinierten bis 1 : 100, 5 bis 1 : 50, 6 bis 1 : 20; bei vier Stämmen war auch bei der Verdünnung 1 : 10 keine Agglutination zu beobachten.

Zu den Versuchen mit Menschenserum wurden drei verschiedene Seren verwendet. Die Versuche wurden mit 11 Stämmen angestellt.

Die Resultate sind im allgemeinen bedeutend ungünstiger als mit Pferde- und Kaninchennormalserum. Bei 1 : 20 wurde in keinem Falle Agglutination beobachtet, bei 1 : 10 nur 2 mal, und sogar bei der stärksten Konzentration von 1 : 5 war die Reaktion nicht mit allen Stämmen positiv.

Aus unseren Versuchen geht hervor, dafs auch nach Zusatz von Normalserum von Menschen, Pferden oder Kaninchen eine Agglutination von Meningokokken eintreten kann. Zwischen den einzelnen Serumarten waren aber nicht unbedeutende Unterschiede zu konstatieren, indem Kaninchenseren in einzelnen Fällen bis 1 : 100, Pferdeserum meist bis 1 : 50, Menschenserum hingegen nicht höher als bis 1 : 10 agglutinierten. In keinem einzigen Falle war eine Agglutination bei 1 : 200 eingetreten.

2. Versuche mit Antisera. (Tabelle X, S. 216.)

Die Versuche wurden mit Diphtherie, Tetanus und Streptokokken-Antiseren aus dem Berner Serum- und Impfinstitut ausgeführt. Es wurden 13 verschiedene Stämme geprüft.

Sämtliche Sera agglutinierten Meningokokken; die individuellen Unterschiede sind klein; in der Höhe der Agglutinationswerte verhielten sich die einzelnen Sera etwas verschieden.

Streptokokken- und Tetanusserum agglutinierten niemals, Diphtherieserum nur einmal bis zur Verdünnung 1 : 100.

Die Zusammenfassung der Resultate ergibt: die 3 geprüften Antisera (Tetanus, Streptokokken und Diphtherieserum) agglutinierten die 13 untersuchten Stämme, aber keinen bis zu der Verdünnung 1:200, einen bis 1:100, die meisten bis 1:50, alle übrigen bis 1:20.

Am stärksten agglutinierend wirkte das Diphtherieserum, etwas schwächer die zwei anderen Seren. Grofse Unterschiede bestanden weder zwischen den einzelnen Seren, noch zwischen den einzelnen Stämmen.

Ein Vergleich zwischen den Normalseren und den geprüften Antiseren führt zu dem Schlusse, dafs die Normalsera und die drei Antisera auf den Meningokokkus agglutinierend wirken, und zwar mit Ausnahme des Menschennormalserums bis zu einer Verdünnung von 1 : 100. Bei 1 : 200 trat niemals Agglutination auf.

Ein deutlicher Unterschied zwischen dem Serum vorbehandelter (mit Diphtherie-Tetanus und Streptokokken) und nicht vorbehandelter Tiere war nicht festzustellen. Die Versuche fielen meistenteils bei 37° günstiger aus wie bei 56—58° C.

### III. Agglutinationsversuche mit anderen Kokken.

Nachdem wir gezeigt haben, dafs Normalsera, Meningokokken- und andere Immunsera auf Meningokokken agglutinierend wirken, bleibt uns noch festzustellen, ob diese Wirkung sich nur auf den Meningokokkus bezieht, oder ob auch andere Kokken von den verschiedenen Seren agglutiniert werden. Wir haben daher mit folgenden Kokken Agglutinationsversuche vorgenommen:

1. Gonokokken. Reinkultur aus Eiter von einem akuten Harnröhrentripper;
2. Mikrococcus catarrhalis;
3. Diplococcus von Jaeger;
4. Diplococcus crassus (von Lingelsheim);[1])
5. Streptokokken von einem Falle von Sepsis;
6. Staphylokokken aus der Mundhöhle rein gezüchtet.

Die Aufschwemmungen wurden in analoger Weise bereitet. Es stellte sich aber bald heraus, dafs diese Kokken, nament-

1) Diese drei Reinkulturen stammen aus dem Kralschen Laborat. in Prag.

lich der Mikrococcus catarrhalis, sich nicht so leicht und gleichmäfsig aufschwemmen lassen wie die Meningokokken. Daher wurde jede Aufschwemmung vor der Zentrifugierung ca. zwei Stunden auf dem Schüttelapparat geschüttelt, was eine bessere Suspension bewirkte. Im übrigen wurden die Versuche in gleicher Weise ausgeführt wie diejenigen mit Meningokokken. Sie seien hier kurz besprochen.

1. Versuche mit Gonokokken. Die hier aufgeführte Tabelle gestattet eine Übersicht über die erhaltenen Resultate:

| Serum | Verdünnung | bei 37° C Resultat n. Stdn. | | bei 56—58° C Resultat n. Stdn. | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 20 | 42 | 20 | 42 |
| Pferdenormalserum . | 1:20 | ++ | +++ | | |
| | 1:50 | + | +++ | — | — |
| | 1:100 | — | — | — | — |
| | 1:200 | — | — | — | — |
| Berner Serum . . . | 1:20 | +++ | +++ | ++ | +++ |
| | 1:50 | ++ | +++ | ++ | +++ |
| | 1:100 | | + | — | |
| | 1:200 | — | | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Merck-Serum . . . | 1:20 | +++ | +++ | + | ++ |
| | 1:50 | ++ | +++ | — | ++ |
| | 1:100 | ++ | +++ | — | |
| | 1:200 | — | ++ | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Berliner Serum. . . | 1:20 | ++ | +++ | + | + |
| | 1:50 | ++ | +++ | ? | + |
| | 1:100 | ++ | +++ | — | |
| | 1:200 | — | ++ | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Tetanusserum . . . | 1:20 | + | +++ | ++ | ++ |
| | 1:50 | + | +++ | — | — |
| | 1:100 | ? | ++ | — | — |
| | 1:200 | — | — | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |
| Streptokokkenserum . | 1:20 | + | +++ | + | + |
| | 1:50 | + | +++ | — | |
| | 1:100 | — | — | — | — |
| | 1:200 | — | — | — | — |
| | 1:500 | — | — | — | — |
| | 1:1000 | — | — | — | — |

Kontrollen bei 37 und 56° negativ.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, agglutinierte Pferdenormalserum Gonokokken bis 1:50; sämtliche geprüften Meningokokkensera agglutinierten bis 1:200, die übrigen Antisera von 1:50 bis 1:100.

2. Versuche mit Mikrococcus catarrhalis. Die Agglutinationen waren schon nach 20 Stunden in so starken Verdünnungen vorhanden, dafs die Röhrchen nochmals geschüttelt wurden und der Befund am zweiten Tage nachgeprüft wurde. Es stellte sich heraus, dafs die Resultate des zweiten Tages ungünstiger waren.

Immerhin zeigt diese Beobachtung, wie vorsichtig man bei der Beurteilung einer Agglutinationsreaktion sein mufs.

3. Versuche mit Diplococcus Jaeger. Mit Ausnahme einer Spur von Agglutination mit den Meningokokkenseren Bern, Merck und Berlin und dem Pferdenormalserum in Verdünnungen von 1:20 und 1:50 waren sämtliche Versuche negativ.

4. Versuche mit Diplococcus crassus (v. Lingelsheim). Pferde- und Kaninchennormalserum agglutinierten bis 1:20, Menschennormalserum bis 1:5. Das Meningokokkenserum Berlin agglutinierte bis 1:100, die übrigen Meningokokkensera bis 1:50 und 1:20, die übrigen Antisera bis 1:50.

5. Versuche mit Streptococcus-pyogenes. Eine genaue Beurteilung der Resultate war nicht möglich, weil neben allen anderen Versuchsröhrchen auch das Kontrollröhrchen etwas aufgehellt war und Bodensatz zeigte. Immerhin war die Agglutination in den Röhrchen mit Streptokokkenserum deutlicher als in den übrigen Röhrchen.

6. Versuche mit Staphylococcus-pyogenes aureus. Staphylokokken wurden vom Kaninchennormalserum nicht, vom Pferdenormalserum bis 1:100, vom Menschennormalserum bis 1:5 agglutiniert.

Von den Meningokokkenseren (mit Ausnahme des Serums So. und Scha.) wurden sie agglutiniert, und zwar von den Seren Bern und Merck bis 1:100, von Serum Berlin bis 1:50, von Serum bis Schr. 1:20.

Von den anderen Antiseren wurden sie bis 1 : 100 und 1 : 50 agglutiniert.

Aus diesen 6 Versuchen ergibt sich, dafs alle geprüften Kokkenarten von den Seren agglutiniert wurden. Die Agglutinationshöhe aber ist eine verschiedene.

## IV. Beurteilung der Befunde.

Die Art und Weise, wie wir unsere Versuche bis jetzt angeführt haben, kann keinen Überblick über unsere Resultate geben. Wir wollen daher in diesem Abschnitte das Wesentliche zusammenstellen und einer kritischen Besprechung unterziehen.

Aus den Agglutinationsversuchen mit anderen Mikroorganismen ist zur Genüge bekannt, dafs die einzelnen Stämme eines und desselben Mikroorganismus sich verschieden verhalten, und dafs die Art der Herstellung der Aufschwemmung für die Höhe der Agglutination ausschlaggebend ist. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dafs anders hergestellte Aufschwemmungen der Meningokokkenstämme etwas günstigere Resultate ergeben hätten. Wenn wir aber die weiter oben angeführte Methode der Zubereitung mit 0,5 proz. Karbolsäurelösung beibehalten haben, so geschah dies namentlich wegen der Einfachheit der Methode, und weil die zuerst ausgeführten Versuche ziemlich günstige Resultate ergeben hatten. Einen Unterschied der Agglutinabilität zwischen Aufschwemmung aus Ascites- und Glyzerinagar konnten wir bei unseren wenigen Parallelversuchen nicht nachweisen.

Eine tüchtige Zentrifugierung der Aufschwemmung war nötig, damit bei der langen Ausdehnung der Versuche keine Pseudo-Agglutination eintrat. Unsere Kontrollröhrchen blieben stets gleichmäfsig getrübt, auch wenn die Beobachtung auf 3—4 Tage ausgedehnt worden war.

Die Agglutination mit den Meningokokken-Pferdeseren trat regelmäfsig auf, aber die einzelnen Stämme reagierten sehr verschieden. Die frischen Stämme liefsen sich durchwegs schlechter agglutinieren als schon längere Zeit, d. h. mehrere Monate lang auf künstlichem Nährboden gezüchtete Stämme.

Die günstigsten Resultate in bezug auf Agglutination haben wir mit dem Bernerserum erhalten; immerhin waren die Unterschiede gegenüber den anderen Seren nicht sehr beträchtlich.

Unsere Agglutinationswerte bewegen sich innert 1 : 20 und 1 : 1000. Agglutination in der Verdünnung von 1 : 1000 erhielten wir, wenn wir die Resultate sämtlicher drei Meningokokken-Pferdeseren summieren, nur bei drei Stämmen. Fünfmal traten Agglutinationen bis 1 : 500 ein; die meisten Stämme agglutinierten bis 1 : 200, wenige bis 1 : 100, einzelne nur bis 1 : 50 und 1 : 20.

Von den geprüften Meningokokkenseren erwies sich also das Bernerserum als das wirksamste. Die höchsten Werte, die mit diesem Serum erhalten worden sind, betragen zweimal 1 : 1000. Das Berliner Serum wirkte ähnlich, agglutinierte aber nur einen Stamm bis 1:1000. Der höchste Wert für das Merck'sche Serum liegt bei 1 : 500. Wenn wir die Verdünnungen berücksichtigen, bei welchen noch deutliche Reaktion eintritt, so ergaben unsere Versuche keine grofsen Unterschiede zwischen den einzelnen geprüften Seren. Im allgemeinen wurden die Stämme regelmäfsig bis 1 : 200 agglutiniert. Ähnlich wie andere Autoren haben auch wir einige schwer agglutinable Meningokokkenstämme gefunden. Diese letzteren wurden nur bei Verdünnungen von 1 : 20 oder 1 : 50 agglutiniert; es waren meistens jüngere Stämme.

Die Höhe der Agglutination war für die einzelnen Sera nicht vollständig parallel; es kam wiederholt vor, dafs der eine Stamm mit dem einen Serum besser, mit dem andern schlechter agglutiniert wurde. So agglutinierte Stamm Ob. mit Serum Berlin bis 1 : 1000, während er mit Serum Bern bis 1 : 200, mit Serum Merck bis 1 : 100 agglutiniert wurde. Umgekehrt verhält sich Stamm Schr. der mit Bernerserum bis 1 : 1000, mit Berliner Serum bis 1 : 100 agglutinierte. Einzig die schlecht agglutinablen Stämme Fr. & We. wiesen mit allen drei Seren ungefähr die gleichen Werte auf. Sie agglutinierten niemals höher als 1 : 50.

Die Agglutination eines und desselben Stammes mit einem und demselben Serum zeigte im allgemeinen zu verschiedenen Zeiten gleiche Werte. Einige Male waren allerdings Unterschiede

festzustellen, die sich aber in ziemlich engen Grenzen bewegten, so Stamm Schra. der einmal mit Berner Serum und gleichzeitig mit Berliner Serum bis 1 : 200 agglutinierte, während er etwas später mit Berner Serum bis 1 : 100, mit Berliner Serum bis 1 : 200 agglutinierte.

Wir wollen noch auf einen Unterschied zwischen den drei Seren aufmerksam machen, der sich ziemlich konstant zeigte. Dieselbe Aufschwemmung wurde von Berner und Berliner Serum in Form eines zusammenhängenden Bodensatzes, mit Merckserum hingegen mehr in Form einer flockigen Ausfällung ausgeschieden.

Fassen wir die Resultate unserer Versuche mit Meningokokken Pferdeserum zusammen, so ergibt sich, dafs von den 18 geprüften Stämmen nur 3 bis 1 : 1000, 3 bis 1 : 500, 10 bis 1 : 200 und 2 bis 1 : 50 agglutiniert wurden.

Ein Vergleich unserer Befunde mit den Resultaten anderer Autoren ergibt, dafs unsere Agglutinationswerte durchwegs niedrigere sind. Man mufs allerdings in Betracht ziehen, dafs der Vergleich nicht streng durchgeführt werden kann, weil wir uns ausschliefslich mit abgetöteten, die Autoren sich meist mit lebenden Bakterien befafst haben.

Von Lingelsheim[1]) gibt allerdings an, dafs er mit abgetöteten fertigen Aufschwemmungen eher günstigere Resultate erhalten habe als mit frischen, lebenden Meningokokken.

Unsere Versuche, durch Chlorkalziumzusatz und Zentrifugierung die Agglutinationen zu verbessern und zu beschleunigen, hatten ein negatives Resultat.

Wir wollen hier zum Vergleiche mit unseren Resultaten die von den einzelnen Autoren gefundenen Werte für die Meningokokkenagglutination anführen.

Kolle und Wassermann[6]) erhielten Werte von 1 : 200 bis 1 : 1500; Jochmann[7]) von 1 : 300 bis 1 : 1500; Jacobitz[8]) von 1 : 200 bis 1 : 2000; v. Lingelsheim[1]) u. Wollenweber[10]) von 1 : 400 bis 1 : 800 und 1 : 1000; die Beobachtungen von Ditthorn und Gildemeister[11]) nähern sich etwas mehr unseren Resultaten, da die meisten Stämme Agglutination bis 1 : 500, einige nur bis 1 : 200 und 1 : 100 aufwiesen. Auffallend

ist beim Vergleich dieser Befunde der Unterschied zwischen den einzelnen Autoren und bei ein und demselben Autor zwischen den einzelnen Stämmen. Wenn auch unsere Resultate im allgemeinen noch ungünstiger lauten als die eben angeführten, so können dieselben doch als mit den übrigen übereinstimmend betrachtet werden.

Die Versuche mit den beiden monovalenten Meningokokkenseren von Kaninchen I und II lieferten Agglutinationen von 1 : 20 bis 1 : 200; dabei zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen der Agglutination homologer und heterologer Stämme. Es kam sogar vor, dafs ein anderer Stamm in etwas höherer Verdünnung agglutinierte als der Stamm womit das Tier vorbehandelt worden war.

Die Versuche mit den Seren der beiden Menningitiskranken ergaben folgende Resultate:

Das Serum von Patient Str. agglutinierte den homologen und einen heterologen Stamm bis 1 : 20.

Das Serum des Patienten Scha. ergab etwas günstigere Resultate; ob die höheren Agglutinationswerte dem injizierten Meningokokkenserum zugeschrieben werden müssen, können wir nicht entscheiden.

Unsere Resultate sind ungünstigere als die von anderen Autoren mitgeteilten. Währenddem das erste Serum nur bis 1:20 agglutinierte, erreichte v. Lingelsheim [1]) Agglutinationswerte mit dem homologen Stamm bis 1 : 200; Jacobitz [2]) sogar bis 1:500. Daneben untersuchten diese und andere Autoren Sera von Meningitiskranken, welche schwach oder gar nicht reagierten.

Die wenig befriedigenden Resultate, die wir mit Meningokokken erhalten haben, sind möglicherweise durch die Unbeweglichkeit dieser Mikroorganismen bedingt. Bekanntlich sind die Resultate der Agglutination mit anderen unbeweglichen Bakterienarten auch nicht so günstig als die mit beweglichen Bakterien erhaltenen.

Es liegt uns fern, die Agglutinationswirkung von Blutserum der mit Meningokokken vorbehandelten Tiere zu bezweifeln; unsere Versuche führen uns aber dazu, den praktischen

Wert der Agglutinationsreaktion nicht so hoch anzuschlagen, wie es von verschiedenen Autoren geschehen ist.

Versuche mit Normalseren und mit Diphtherie-, Tetanus- und Streptokokkenseren. Für die Beurteilung des praktischen Wertes der Agglutination der Meningokokken erscheinen uns diese Versuche von sehr grofser Bedeutung. Es sei gleich hier nochmals hervorgehoben, dafs wir in vielen Fällen mit Normalserum und mit Seren von Tieren, die mit anderen Bakterien als mit Meningokokken vorbehandelt waren, deutliche Agglutination der Meningokokken beobachten konnten. Der Hauptunterschied bestand im allgemeinen in der Höhe der Verdünnung, bei welcher noch Agglutination eintrat. So wurde z. B., wie aus der Tabelle ersichtlich ist, Stamm Ob. mit den nicht spezifischen Seren von 1 : 50 bis 1 : 100 vom Meningokokkenserum Berlin bis 1 : 1000 — Stamm Bam. mit Meningokokkenseren von 1 : 200 bis 1 : 1000, von Normalseren von 1 : 50 bis 1 : 100 agglutiniert.

Tabelle.

| Bezeichnung des Serums | Bezeichnung der Stämme | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Bam. | Ob. | Bäch. | Fr. |
| Berner Serum . . | 1 : 1000 | 1 : 200 | 1 : 200 | 1 : 50 |
| Berliner Serum . . | 1 : 200 | 1 : 1000 | 1 : 100 | 1 : 20 |
| Merck-Serum . . . | 1 : 500 | 1 : 100 | 1 : 100 | 1 : 20 |
| Pf. Normal-Serum . | 1 : 50 | 1 : 50 | 1 : 20 | 1 : 20 |
| K. » » . | 1 : 100 | 1 : 100 | 1 : 20 | 1 : 20 |
| Diphtherieserum . | | 1 : 100 | 1 : 20 | 1 : 20 |
| Tetanusserum . . | | 1 : 50 | 1 : 20 | 1 : 50 |
| Streptokokkenser. . | | 1 : 50 | 1 : 20 | 1 : 20 |

Vergleichen wir die maximalen Werte, welche mit Meningokokkenserum einerseits, mit nicht spezifischen Seren anderseits erhalten worden sind, so müssen wir hervorheben, dafs in einer Anzahl von Fällen der Unterschied gering, oder dafs gar kein Unterschied zu konstatieren war. — Die gröfste Differenz war bei dem Stamm Schr. zu beobachten, der mit Pferde- und Kaninchen-Normalserum bis 1 : 50, mit spez. Serum bis 1 : 1000

agglutinierte. (Mit Diphtherie-, Tetanus- und Streptokokkenserum wurde dieser Stamm nicht geprüft.) Ihm folgte Stamm Ob., der mit nicht spezifischem Serum bis 1 : 100, mit Meningokokkenserum Berlin bis 1 : 1000 agglutinierte. Keinen Unterschied in der Agglutination mit spezifischen und nichtspezifischen Seren zeigte Stamm Fr., der bis 1 : 50 agglutinierte (siehe Tabelle).

Einen Mittelwert weist Stamm Bäch. auf, der mit Meningokokkenseren von 1 : 100 bis 1 : 200, mit nicht spez. Seren bis 1 : 20 agglutiniert wurde.

Von den 13 mit Diphtherie-, Tetanus- und Streptokokkenserum geprüften Stämmen agglutinierte einer bis 1 : 100, sämtliche übrigen deutlich bis 1 : 50. Ob die Antisera durch Behandlung mit anderen Bakterien auch auf die Meningokokken stärker agglutinierend wirken, ist sehr schwer zu entscheiden; jedenfalls sind die Unterschiede zwischen der Agglutination mit Pferdenormalseren und den untersuchten Antiseren sehr gering, da sämtliche Sera ziemlich regelmäfsig bis 1 : 50, selten bis 1 : 100 agglutinierten.

Unsere Versuche haben ergeben, dafs Normalserum, Diphtherie-, Tetanus- und Streptokokkenserum die Meningokokken bis 1 : 100 agglutinierten.

Die Versuche mit meningokokkenähnlichen Mikroorganismen zeigten, dafs nicht nur die Meningokokken, sondern auch ähnliche Mikrokokken von spezifischem und nicht spezifischem Serum agglutiniert werden. Der Diplococcus crassus agglutinierte mit Normalserum bis 1 : 20, mit Meningokokkenseren von 1 : 20 bis 1 : 100, während der Diplococcus von Jaeger Spuren von Agglutination mit Meningokokkenseren bei 1 : 20 und 1 : 50 aufwies.

Diese Resultate stehen im Widerspruch mit denjenigen von v. Lingelsheim [1]), der mit Diplococcus Jaeger Agglutinationen von 1 : 400 bis 1 : 800 erhielt, dagegen nähern sie sich denjenigen von Jochmann [7]), der mit Diplococcus Jaeger überhaupt keine Spur von Agglutination beobachtete.

Der Gonokokkus wurde von den Meningokokkenseren bis 1 : 200 agglutiniert; unsere Resultate decken sich somit vollständig mit den Beobachtungen von Vannod.[12])

Auffällig sind unsere Resultate mit Mikrococcus catarrhalis.

Da wir nur mit einem Stamm gearbeitet und nur eine Versuchsreihe ausgeführt haben, wollen wir uns einen Schlufs aus diesem Befunde nicht gestatten.

Der höchste Agglutinationswert, den wir mit Meningokokken erreicht haben, war 1 : 1000; meningokokkenähnliche Mikroorganismen wurden von denselben Seren bis 1 : 200 agglutiniert.

## Schlufsfolgerungen.

1. Blutseren von mit Meningokokken vorbehandelten Tieren üben einen agglutinierenden Einflufs auf Meningokokken in Aufschwemmungen aus. Die Agglutinationswerte der einzelnen Stämme sind sehr verschieden. Bei den einen Aufschwemmungen war eine Agglutination bis 1 : 1000, bei anderen mit dem gleichen Serum nur bis 1 : 20 oder 1 : 50 zu beobachten.

Die einzelnen Stämme verhalten sich gegenüber den 3 Seren nicht ganz gleich. Immerhin können die 18 von uns geprüften Stämme in leicht-, mittelschwer- und in schwer-agglutinable eingeteilt werden. Die schwer agglutinablen Meningokokkenaufschwemmungen, meist frisch von Patienten gewonnen, wurden weder von dem einen noch von dem anderen Serum höher als 1 : 50 agglutiniert. Die leichter agglutinablen wurden von dem einen Serum bis 1 : 1000, von dem andern nur bis 1 : 100 agglutiniert. Bei wiederholter Prüfung zu verschiedenen Zeiten wurde im allgemeinen übereinstimmende Werte erhalten.

Der Titer der einzelnen geprüften Meningokokken-Pferdesera (Bern, Berlin und Merck) variierte in nur engen Grenzen. Serum Bern und Berlin erreichten den höchsten Agglutinationswert mit 1 : 1000, Serum Merck mit 1 : 500.

Im allgemeinen sind die von uns gefundenen Werte nicht so hoch wie die von anderen Autoren angegebenen. Viel-

leicht hängt dies damit zusammen, dafs unsere Versuche mit fertigen, mit Karbolsäure abgetöteten Aufschwemmungen ausgeführt wurden.

Die Versuche mit Serum von Kaninchen, welche nur mit einem einzigen Meningokokkenstamm vorbehandelt worden waren, haben ergeben, dafs ein deutlicher Unterschied der Agglutination zwischen den eigenen und den übrigen Stämmen nicht besteht, dafs die leichter agglutinablen Stämme von dem univalenten Serum in gleicher oder sogar in höherer Verdünnung als der homologe Stamm agglutiniert werden.

2. Die zwei geprüften Sera von Meningitiskranken zeigen keine starke agglutinierende Eigenschaft. Das eine von dem mit Meningokokkenserum vorbehandelten Patienten agglutinierte bis 1 : 200, das andere nur bis 1 : 20.

3. Normalsera, sowie Diphtherie-, Tetanus- und Streptokokken-Pferdesera agglutinieren die Meningokokken ebenfalls, aber die Agglutinationen sind meist nicht so hoch wie die mit Meningokokkenseren. Ihr oberster Grenzwert liegt bei der Verdünnung 1 : 100.

4. Bei Zimmertemperatur werden die Meningokokken nicht so leicht agglutiniert; höhere Temperaturen (35—37° und 56—58° C) bewirken eine raschere und bessere Agglutination. Das Maximum der Agglutination tritt erst am zweiten Tage nach etwa 38—42 Stunden auf, nur ausnahmsweise schon innerhalb 24 Stunden.

5. Den Zusatz von 0,2% Chlorkalzium zur Aufschwemmung oder das Zentrifugieren des Serum-Meningokokkengemisches hat in unseren Versuchen eine Verbesserung oder eine Beschleunigung der Agglutinationsreaktion nicht bewirkt.

6. Meningokokkenserum agglutinierte auch mit dem Meningokokkus verwandte Kokken, speziell die Gram-negativen Gonokokken bis zur Verdünnung 1 : 200. Andere Kokken, wie Diplococcus crassus (v. Lingelsheim) wurden bis 1 : 100 agglutiniert. Versuche mit Normalseren haben ähnliche Resultate ergeben.

7. Ein wissenschaftlicher Wert soll der Agglutination der Meningokokken nicht abgesprochen werden; dagegen müssen wir auf Grund unserer Untersuchungen schliefsen, dafs die Agglutinationsreaktion weder für die Diagnose der Meningokokken noch für die Differenzierung ähnlicher Mikroorganismen als ausschlaggebend betrachtet werden kann. Wir können ihr somit einen grofsen praktischen Wert einstweilen nicht zuerkennen. So angenehm es wäre, in dieser einfachen Methode ein sicheres Mittel zu besitzen, so gefährlich ist es auf der andern Seite, eine Methode, welche so variable Werte ergibt, allgemein einzuführen, als Grundlage für die Diagnose und Differentialdiagnose von Mikroorganismen.

Die Diagnose des Meningokokkus aus Cerebrospinalflüssigkeit ist leicht bei richtiger Entnahme und bei frühzeitiger Untersuchung. Der Nachweis der Meningokokken in der Mundhöhle und auf anderen Schleimhäuten ist schwierig, und auch auf Grund der Agglutinationsreaktion nicht leichter geworden.

Zum Schlusse fühle ich mich verpflichtet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Silberschmidt, meinen herzlichsten Dank auszusprechen für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für das rege Interesse und die guten Ratschläge, mit denen er mich stetsfort unterstützt hat.

---

Tabelle I. **Agglutination mit Meningokokkenserum Bern.**

| Bezeichnung des Stammes | Generation | Alter in Tgn. der Kultur | Alter in Tgn. der Aufschw | Res in Std | a) bei Bruttemperatur Verdünnungen 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle | b) bei 56—58° Verdünnungen 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 45 | 1 | fr. | 16 | +++ | + | — | — | — | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ | — | — | — |
| 2. Me. | 45 | | » | 19 | ++ | ++ | + | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — |
| | | | | 39 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 3 Dös. | 41 | 3 | » | 22 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 48 | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — | ++ | + | + | — | — | — | — |
| 4 Br. | 38 | 3 | 3 | 16 | +++ | + | + | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — |
| 5. Schü. | 33 | 1 | fr. | 16 | +++ | +++ | +++ | □ | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — |
| | | | | 38 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — |
| 6 We. | 37 | 2 | » | 20 | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | ++ | ? | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — |
| 7. Schr. | 31 | 1 | » | 16 | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — |
| | | | | 38 | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| 8. Ob. | 35 | 2 | » | 18 | ++ | ++ | + | — | — | — | — | + | + | + | ? | — | — | — |
| | | | | 40 | ++ | ++ | + | — | — | — | — | ++ | ++ | + | + | — | — | — |
| 9. Bam. | 30 | 1 | » | 16 | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — |
| | | | | 38 | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — |
| 10. Fa. | 29 | 2 | 1 | 16 | ++ | + | — | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | + | + | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — |
| 11. So. | 15 | 1 | fr. | 16 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | +++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — | — |
| 12. Wz. | 7 | 1 | » | 16 | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — |
| | | | | 64 | +++ | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — |
| 13. Scha. | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 43 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | + | ? | ? | — | — | — | — |
| 14. Str | 4 | 2 | 3 | 20 | +++ | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — | + | + | + | ? | — | — | — |
| 15. Mil. | 4 | 1 | 3 | 15 | ++ | + | □ | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | ? | — | — |
| | | | | 41 | ++ | ++ | ++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — |
| 16. Fr. | 4 | 1 | fr. | 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | ++ | — | — | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — |
| 17. Schra. | 3 | 2 | 2 | 19 | +++ | +++ | □ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — |
| 18. Bet. | 2 | 2 | fr. | 16 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — |

Tabelle II. **Agglutination mit Meningokokkenserum Berlin.**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 42 | 3 | fr. | 17 | +++ | + | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | ++ | + | ? | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| 2. Me. | 45 | 2 | › | 19 | +++ | ++ | ++ | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | □ | — | — | — |
| | | | | 39 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — |
| 3. Dös. | 41 | 3 | › | 22 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | 48 | +++ | +++ | +++ | | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| 4. Br. | 38 | 3 | 3 | 16 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | + | — | — |
| 5 Schü. | 34 | 2,5 | fr. | 16 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | +++ | ++ | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — |
| 6. We. | 37 | 2 | › | 20 | + | + | ? | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | ++ | + | — | — | — | — | — | + | ? | — | — | — | — | — |
| 7. Schr. | 32 | 2,5 | › | 16 | ++ | ++ | — | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | □ | — | — | — | — | +++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 8. Ob. | 35 | 2 | › | 18 | +++ | + | □ | — | — | — | — | +++ | + | ? | ? | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | + | □ | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | — |
| 9. Bam. | 31 | 2,5 | › | 16 | ++ | ++ | | — | — | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | ? | ? | ? | — | — | — |
| 10. Fa. | 29 | 2 | 1 | 16 | +++ | +++ | ? | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 11. So. | 16 | 2,5 | fr. | 16 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | ++ | ? | — | — | — | — | — |
| 12. Wz. | 8 | 2,5 | › | 16 | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — | +++ | +++ | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | +++ | + | □ | — | — | — |
| 13. Scha. | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 43 | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| 14. Str. | 4 | 2 | 3 | 20 | ++ | + | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| 15. Mil. | 4 | 2 | 3 | 15 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | ++ | □ | — | — | — | — | — |
| | | | | 44 | +++ | +++ | +++ | □ | — | — | — | +++ | + | + | + | — | — | — |
| 16. Fr. | 4 | 1 | fr. | 20 | + | — | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | ++ | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| 17. Schra. | 3 | 2 | 2 | 19 | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — | ++ | ? | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | +++ | ++ | — | — | — | — | — |
| 18. Bet. | 2 | 1 | fr. | 16 | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | ++ | ++ | ++ | + | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ | — | — | — |

Tabelle III. **Agglutination mit Meningokokkenserum Merck.**

| Bezeichnung des Stammes | Generation | Alter in Tagn. d. Kultur | Alter in Tagn. d. Aufschw. | Result. n. St. | a) bei Bruttemperatur: Verdünnungen 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle | b) bei 56—58°: Verdünnungen 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 45 | 1 | fr. | 16 | ++ | + | — | — | — | — | — | + | + | + | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | + | □ | — | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 2. Me. | 45 | 2 | » | 19 | ++ | + | □ | ? | — | — | — | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — |
| | | | | 39 | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — | — |
| 3. Dös. | 41 | 3 | » | 22 | ++ | + | + | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — |
| | | | | 48 | ++ | ++ | + | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| 4. Br. | 38 | 3 | 3 | 16 | □ | □ | □ | — | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — |
| | | | | 40 | + | + | + | ? | — | — | — | ++ | ++ | ++ | + | — | — | — |
| 5. Schü. | 32 | 3 | 5,5 | 15 | + | + | + | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — |
| | | | | 64 | ++ | + | + | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| 6. We. | 37 | 2 | fr. | 20 | ? | ? | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | + | + | — | — | — | — | — | ? | ? | — | — | — | — | — |
| 7. Schr. | 29 | 3 | 1 | 16 | ++ | + | — | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| | | | | 48 | ++ | ++ | + | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | ? | — | — |
| 8. Ob. | 35 | 2 | fr. | 18 | ? | ? | ? | — | — | — | — | ++ | + | □ | — | — | — | — |
| | | | | 40 | ++ | ++ | ++ | — | — | — | — | ++ | ++ | ++ | ? | — | — | — |
| 9. Bam. | 28 | 3 | 3 | 15 | +++ | +++ | + | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| | | | | 39 | +++ | +++ | +++ | ++ | □ | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | □ | — | — |
| 10. Fa. | 29 | 2 | 1 | 16 | □ | □ | ? | — | — | — | — | + | + | ? | — | — | — | — |
| | | | | 41 | + | + | + | □ | — | — | — | ++ | + | + | □ | — | — | — |
| 11. So. | 12 | 2 | fr. | 16 | ++ | — | — | — | — | — | — | +++ | +++ | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | +++ | +++ | + | ? | — | — | — | +++ | +++ | + | — | — | — | — |
| 12. Wz. | 5 | 2 | 18 | 23 | □ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| . Scha. | 5 | 2 | 1 | 16 | + | + | — | — | — | — | — | ++ | ++ | □ | — | — | — | — |
| | | | | 43 | ++ | ++ | ++ | + | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 14. Str. | 4 | 2 | 2 | 20 | □ | □ | □ | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | ++ | ++ | ++ | ? | — | — | — | + | + | ? | — | — | — | — |
| 15. Mil. | 4 | 1 | 3 | 15 | +++ | ++ | + | ? | — | — | — | ++ | ++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | 44 | +++ | +++ | ++ | ++ | — | — | — | ++ | ++ | ++ | □ | — | — | — |
| 16. Fr. | 4 | 1 | fr. | 20 | ? | — | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | — | — | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — |
| 17. Schra. | 3 | 2 | 2 | 19 | + | + | — | — | — | — | — | ++ | ++ | □ | — | — | — | — |
| | | | | 40 | ++ | ++ | ++ | + | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 18. Bet. | 2 | 1 | fr | 16 | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | ++ | + | ? | — | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ | — | — | — |

Tabelle IV. Agglutination mit Meningokokkenserum So. von Kaninchen I.

| Bezeichnung des Stammes | Datum des Versuches | Zahl der Injektion | Alter in Tagen d. Kult. | Alter in Tagen d. Aufschw. | Res. n. Std. | Verdünnungen 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle | Verdünnungen 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1. So.** | 1907 16.II. | 3 | 2 | fr. | 16 | □ | – | – | – | – | – | – | +++ | +++ | +++ | – | – | – | – |
| | | | | | 64 | +++ | +++ | +++ | + | – | – | – | +++ | +++ | +++ | ++ | – | – | – |
| 2. Schr. | 18. » | 3 | 3 | 1 | 16 | +++ | + | – | – | – | – | – | +++ | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 48 | +++ | ? | ? | – | – | – | – | +++ | +++ | – | – | – | – | – |
| 3. Bam. | 27. » | 4 | 3 | 2 | 15 | ++ | + | – | – | – | – | – | ++ | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 39 | +++ | +++ | + | – | – | – | – | +++ | + | – | – | – | – | – |
| 4 Schü. | 1 III | 4 | 3 | 5,5 | 15 | ++ | + | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 64 | ++ | + | – | – | – | – | – | +++ | + | + | – | – | – | – |
| 5. Wz. | 5. » | 4 | 2 | 13 | 23 | ++ | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 42 | ++ | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 6. Scha | 12. » | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | ++ | □ | – | – | – | – | +++ | ++ | ? | – | – | – | – |
| | | | | | 43 | +++ | +++ | +++ | □ | – | – | – | +++ | +++ | +++ | – | – | – | – |
| 7. Fa. | 13. » | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | +++ | □ | – | – | – | – | ++ | ++ | – | – | – | – | – |
| | | | | | 41 | +++ | ++ | + | □ | – | – | – | +++ | +++ | + | – | – | – | – |
| 8 Str. | 6.IV. | 7 | 2 | 3 | 20 | +++ | ++ | + | ? | – | – | – | +++ | ++ | ? | – | – | – | – |
| | | | | | 42 | +++ | +++ | ++ | + | – | – | – | +++ | +++ | + | ? | – | – | – |
| 9. Mil. | 19. » | 7 | 1 | 3 | 15 | +++ | +++ | + | – | – | – | – | ++ | ++ | ++ | + | – | – | – |
| | | | | | 41 | +++ | +++ | ++ | ++ | – | – | – | ++ | ++ | ++ | ++ | – | – | – |
| 10. Br. | 23. » | 7 | 3 | 3 | 16 | +++ | +++ | ++ | – | – | – | – | +++ | ++ | + | ? | – | – | – |
| | | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | + | – | – | – | +++ | ++ | ++ | □ | – | – | – |
| 11. Dös. | 24 » | 7 | 3 | fr. | 22 | +++ | +++ | + | – | – | – | – | +++ | ++ | ++ | – | – | – | – |
| | | | | | 48 | +++ | +++ | ++ | – | – | – | – | +++ | +++ | ++ | – | – | – | – |
| 12. Bäch | 25 » | 7 | 1 | » | 16 | ++ | – | – | – | – | – | – | ++ | ? | – | – | – | – | – |
| | | | | | 41 | +++ | □ | – | – | – | – | – | +++ | ++ | □ | – | – | – | – |
| 13. We. | 1.V. | 7 | 2 | » | 20 | +++ | ? | – | – | – | – | – | ++ | + | – | – | – | – | – |
| | | | | | 42 | +++ | ++ | – | – | – | – | – | +++ | + | + | ? | – | – | – |
| 14. Ob. | 2. » | 7 | 2 | » | 18 | ++ | ++ | ? | – | – | – | – | +++ | ++ | □ | – | – | – | – |
| | | | | | 40 | +++ | ++ | – | – | – | – | – | +++ | +++ | ++ | ? | – | – | – |
| 15. Schra. | 10. » | 7 | 3 | 3 | 15 | ++ | + | – | – | – | – | – | ++ | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 39 | +++ | +++ | + | – | – | – | – | +++ | + | – | – | – | – | – |
| 16. Me. | 15. » | 7 | 2 | 2 | 19 | ++ | + | – | – | – | – | – | ++ | ++ | – | – | – | – | – |
| | | | | | 39 | +++ | +++ | □ | – | – | – | – | +++ | ++ | ? | – | – | – | – |
| 17. Fr. | 17. » | 7 | 1 | fr. | 20 | – | – | – | – | – | – | – | □ | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 40 | + | □ | – | – | – | – | – | ++ | – | – | – | – | – | – |
| 18. Bet. | 21. » | 7 | 1 | » | 16 | ++ | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | | | | | 40 | +++ | ++ | + | ? | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – |
| **1. So.** | 6.VI. | 7 | 1 | » | 20 | +++ | ++ | □ | – | – | – | – | +++ | +++ | ++ | – | – | – | – |
| | | | | | 48 | +++ | +++ | ++ | – | – | – | – | +++ | +++ | ++ | □ | – | – | – |

Tabelle V. **Agglutination mit Meningokokkenserum Sehr. von Kaninchen II.**

| Bezeichnung des Stammes | Datum des Versuches | Zahl der Injektion | Alter in Tagen: Kult. | Alter in Tagen: Aufschw. | Res. n. Std. | a) bei Bruttemperatur: Verdünnungen 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle | b) bei 56—58° B: Verdünnungen 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1907 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. **Schr.** | 18 II | 3 | 3 | 1 | 16 | — | — | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — |
| | | | | | 48 | — | — | — | — | — | — | — | ++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| 2. Bam. | 27. » | 4 | 3 | 3 | 15 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| | | | | | 39 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | ++ | + | ? | — | — | — | — |
| 3. Schü. | 1.III | 4 | 3 | 5,5 | 15 | + | — | — | — | — | — | — | +++ | ++ | — | — | — | — | — |
| | | | | | 64 | ++ | ? | — | — | — | — | — | +++ | +++ | + | + | — | — | — |
| 4. Wz. | 5. » | 5 | 2 | 13 | 23 | + | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | | 42 | + | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| 5. Scha. | 12. » | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | | 43 | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| 6. Fa. | 13. » | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | | 41 | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | | — | — | — |
| 7. Str. | 6.IV | 7 | 2 | 3 | 20 | +++ | ++ | ++ | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| | | | | | 42 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| 8. Mil. | 19. » | 7 | 1 | 3 | 15 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — |
| | | | | | 41 | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| 9. Br. | 23. » | 7 | 3 | 3 | 16 | +++ | +++ | ++ | | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| | | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — |
| 10. Dös. | 24. » | 7 | 3 | fr. | 22 | +++ | — | — | — | — | — | — | +++ | +++ | + | — | — | — | — |
| | | | | | 48 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — |
| 11. Bäch. | 25. » | 7 | 1 | » | 16 | | ? | — | — | — | — | — | + | + | | — | — | — | — |
| | | | | | 41 | + | □ | ? | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — |
| 12. We. | 1. V. | 7 | 2 | » | 20 | + | | — | — | — | — | — | + | + | | ? | — | — | — |
| | | | | | 42 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | + | — | — | — |
| 13 Ob. | 2. » | 7 | 2 | » | 18 | +++ | + | ? | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | | 40 | +++ | + | ? | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — |
| 14. Schra. | 10. » | 7 | 2 | 2 | 19 | ++ | + | — | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | ? | — | — | — |
| | | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | — | — | — |
| 15. Me. | 15. » | 7 | 2 | 2 | 19 | ++ | ++ | + | ? | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| | | | | | 39 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — |
| 16. Fr. | 17. » | 7 | 1 | fr. | 20 | ? | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | | 40 | + | + | — | — | — | — | — | ++ | □ | — | — | — | — | — |
| 17. Bet. | 21. » | 7 | 1 | » | 16 | +++ | + | — | — | — | — | — | +++ | ++ | — | — | — | — | — |
| | | | | | 40 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — |
| 18. So. | 6.VI | 7 | 2 | » | 20 | ++ | + | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| | | | | | 48 | +++ | ++ | □ | — | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — |
| 1. **Schr.** | 6. » | 7 | 2 | » | 20 | | — | — | — | — | — | — | □ | — | | — | — | — | — |
| | | | | | 48 | ++ | + | + | ? | — | — | — | +++ | ++ | + | ? | — | — | — |

| Bezeichnung des Stammes | Generation | Alter in Tagen der Kult. | Alter in Tagen der Aufschw. | Resultat nach Std. | a) bei Bruttemperatur Verdünnungen 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle | b) bei 56–58° C: Verdünnungen 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 45 | 1 | fr. | 16 | ++ | + | — | — | — | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | ++ | + | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| 2. Me. | 45 | 2 | 2 | 19 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | +++ | + | — | — | — | — | — |
| | | | | 39 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | +++ | ++ | — | — | — | — | — |
| 3. Dös. | 41 | 3 | fr. | 22 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | +++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 48 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | +++ | + | — | — | — | — | — |
| 4. Br. | 38 | 3 | 3 | 16 | ++ | ++ | — | — | — | — | — | +++ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | +++ | □ | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — |
| 5. Schü. | 34 | 2 | 13 | 16 | +++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | +++ | □ | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — |
| 6. We. | 37 | 2 | fr. | 20 | [illegible] | — | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | ++ | — | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| 7. Schr. | 30 | 2 | 13 | 16 | + | — | — | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | ++ | — | — | — | — | — | — | + | + | □ | — | — | — | — |
| 8. Ob. | 35 | 2 | fr. | 18 | ++ | ? | ? | — | — | — | — | + | ? | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | + | ? | — | — | — | — | ++ | ++ | — | — | — | — | — |
| 9. Bam. | 30 | 2 | 13 | 16 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | + | [illegible] | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — |
| 10. Fa. | 29 | 2 | 1 | 16 | ++ | ? | — | — | — | — | — | ++ | ? | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| 11. So. | 16 | 2 | 13 | 16 | ++ | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | ++ | ++ | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — |
| 12. Wz. | 6 | 2 | 13 | 16 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | — | — | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — |
| 13. Scha. | 5 | 2 | 1 | 16 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 43 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — |
| 14. Str. | 4 | 2 | 3 | 20 | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 42 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | ++ | ? | — | — | — | — | — |
| 15. Mil. | 4 | 1 | 3 | 15 | ++ | ++ | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 41 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | ++ | ++ | ? | — | — | — | — |
| 16. Fr. | 4 | 1 | fr. | 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 17. Schra | 3 | 2 | 2 | 19 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | ++ | ++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 18. Bet. | 2 | 1 | fr. | 16 | +++ | — | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — |
| | | | | 40 | +++ | + | ? | — | — | — | — | ++ | ++ | ? | — | — | — | — |

Tabelle VII. **Agglutination mit Blutserum von Patient Str.**

| Bezeichnung des Stammes | Generation | Alter in Tagen der Kult. | Alter in Tagen der Aufschw. | Resultat nach Std. | a) 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle | b) 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Str. | 4 | 2 | 3 | 17 | ? | — | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 60 | ++ | ? | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 2. Scha. | 5 | 3 | 3 | 17 | ? | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 60 | + | ? | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Tabelle VIII. **Agglutination bei**

A. Mit Kaninchen-

| Bezeichnung des Stammes | Generation | Alter in Tagen der Kultur | Alter in Tagen der Aufschw. | Resultat n. Stdn. | a) bei Zimmertemperatur (16—18° C) Verdünnungen 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Schü. | 32 | 3 | 5,5 | 15 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | + | + | — | — | — | — | — | — |
| 2. Schr. | 29 | 3 | 1 | 16 | ? | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 48 | + + | □ | □ | — | — | — | — | — |
| 3. Bam. | 28 | 3 | 3 | 15 | □ | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 39 | + + | + + | + | — | — | — | — | — |
| **B. Mit Meningokokkenserum** | | | | | | | | | | | | |
| 1. Schü. | 32 | 3 | 5,5 | 15 | + | + | □ | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | + + | + + | + | — | — | — | — | — |
| 2. Schr. | 29 | 3 | 1 | 16 | + + | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 48 | + + + | + + + | □ | — | — | — | — | — |
| 3. Bam. | 28 | 3 | 3 | 15 | + + | + + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 39 | + + + | + + + | □ | □ | — | — | — | — |
| 4. So. | 12 | 2 | fr. | 16 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | + | □ | ? | — | — | — | — | — |
| **C. Mit Meningokokkenserum** | | | | | | | | | | | | |
| 1. Schü. | 32 | 3 | 5,5 | 15 | + | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | + + | + | □ | — | — | — | — | — |
| 2. Schr. | 29 | 3 | 1 | 16 | + + + | + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 48 | + + + | + + | — | — | — | — | — | — |
| 3. Bam. | 28 | 3 | 3 | 15 | + + | + + | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 39 | + + + | + + + | + | — | — | — | — | — |
| **D. Mit Meningokokken-** | | | | | | | | | | | | |
| 1. Schü. | 32 | 3 | 5,5 | 15 | — — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | + + | + | ? | — | — | — | — | — |
| 2. Schr. | 29 | 3 | 1 | 16 | ? | ? | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 48 | + + + | + + | + | ? | — | — | — | — |
| 3. Bam. | 28 | 3 | 3 | 15 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | | | 39 | □ | □ | □ | □ | — | — | — | — |
| 4. So. | 12 | 2 | frisch | 16 | ? | ? | ? | — | — | — | — | — |
| | | | | 64 | + | + | + | — | — | — | — | — |

**drei verschiedenen Temperaturen.**

Normalserum.

| b) Bruttemperatur Verdünnungen | | | | | | | | c) bei 56–58° C Verdünnungen | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | Kontrolle |
| + | + | − | − | − | − | − | − | □ | − | − | − | − | − | − | − |
| − + | + | − | − | − | − | − | − | + + | + | − | − | − | − | − | − |
| + + | + + | − | − | − | − | − | − | + + + | + + | + | − | − | − | − | − |
| + + | + + | + + | ? | − | − | − | − | + + + | + + | + | − | − | − | − | − |
| − + | + + | ? | − | − | − | − | − | + + + | + + | + | − | − | − | − | − |
| + + + | + + + | + | + | − | − | − | − | + + + | + + + | + + + | − | − | − | − | − |

So. von Kaninchen I.

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + + + | + + | + | − | − | − | − | − | + + + | + | − | − | − | − | − | − |
| + + | + + | + | − | − | − | − | − | + + + | + + + | + | + | − | − | − | − |
| − + + | + + + | + | ? | − | − | − | − | + + + | + + + | − | − | − | − | − | − |
| + + + | + + + | + | ? | − | − | − | − | + + + | + + + | + + + | − | − | − | − | − |
| + + + | + + | + | − | − | − | − | − | + + | + + | − | − | − | − | − | − |
| − + + | + + + | + + + | + | − | − | − | − | + + + | + + + | + | − | − | − | − | − |
| + + + | □ | − | − | − | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | − | − | − |
| + + + | + + + | + + + | + + + | + | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | − | − | − |

Schr. von Kaninchen II.

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + + + | + | − | − | − | − | − | − | + + + | + + | − | − | − | − | − | − |
| − + + | + + | ? | − | − | − | − | − | + + + | + + + | + | + | − | − | − | − |
| + + + | + + | − | − | − | − | − | − | + + + | + | + | − | − | − | − | − |
| − + + | + + | □ | − | − | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + | − | − | − | − |
| − + + | + + + | + + | − | − | − | − | − | + + + | + + | + | − | − | − | − | − |
| − − + | + + + | + + + | ? | − | − | − | − | + + + | + + | + | ? | − | − | − | − |

serum Merck.

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | + | + | ? | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | − | − | − | − |
| − + | + + | + | + | ? | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | − | − | − |
| − + | + + | + | − | − | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | − | − | − |
| − + | + + | + + | + | + | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | ? | − | − |
| − + + | + + + | + + + | + | ? | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | − | − | − |
| − + + | + + + | + + + | + + + | + + | □ | − | − | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | □ | − | − |
| − + + | + + | − | − | − | − | − | − | + + + | + + + | + + + | − | − | − | − | − |
| − + + | + + + | + + + | + | ? | − | − | − | + + + | + + + | + + + | + | − | − | − | − |

Tabelle IX.

**Agglutinationsversuche mit Normalseren.**

a) Mit Pferdenormalserum.

| Bezeichnung des Stammes | Resultat in Stunden | a) Bruttemperatur Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | Kontrolle | Resultat in Stunden | b) bei 56—58° Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 41 | | + + | — | — | — | — | 41 | | + | — | — | — | — |
| 2. Me. | 39 | | + | + | — | — | — | 39 | | + | — | — | — | — |
| 3. Dös. | 48 | | + | ? | — | — | — | 48 | | + | — | — | — | — |
| 4. Br. | 40 | | + | + | — | — | — | 40 | | + + + | + | — | — | — |
| 5. Schü. | 38 | + + | + | ? | — | — | — | 38 | + + | + + | + | — | — | — |
| 6. We. | 42 | | ⊔ | — | — | — | — | 42 | | + + | + | — | — | — |
| 7. Schr. | 38 | + + + | + + | + | — | — | — | 38 | + | + | ? | — | — | — |
| 8. Ob. | 40 | | + + | + | — | — | — | 40 | | + + + | + + | — | — | — |
| 9. Bam. | 38 | + + + | + + | ? | — | — | — | 38 | + + + | + + + | + + | ? | — | — |
| 10. Fa. | 41 | | + | — | — | — | — | 41 | | + | — | — | — | — |
| 11. So. | 64 | + + + | + + | + | — | — | — | 64 | + + | + + | ? | — | — | — |
| 12. Wz. | 64 | + + + | + + | + | — | — | — | 64 | + + + | + + + | + + | — | — | — |
| 13. Scha | 43 | + + + | + + | — | — | — | — | 43 | — | — | — | — | — | — |
| 14. Str. | 42 | | ⊔ | — | — | — | — | 42 | | + | — | — | — | — |
| 15. Mil. | 41 | | + + + | + + | — | — | — | 41 | | + + | + | — | — | — |
| 16. Fr. | 40 | | ⊔ | — | — | — | — | 40 | | ⊔ | — | — | — | — |
| 17. Schra. | 40 | | + + + | + + | — | — | — | 40 | | — | — | — | — | — |
| 18. Bet. | 40 | | + + + | + + | — | — | — | 40 | | + | — | — | — | — |

b) Versuche mit Kaninchennormalserum.

| Bezeichnung des Stammes | Resultat in Stunden | a) Bruttemperatur Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | Kontrolle | Resultat in Stunden | b) bei 56—58° Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 41 | | — | — | — | — | — | 41 | | + | — | — | — | — |
| 2. Me. | 39 | | + + + | + + | ? | — | — | 39 | | + + + | + + + | — | — | — |
| 3. Dös. | 48 | | + | ? | — | — | — | 48 | | — | — | — | — | — |
| 4. Br. | 40 | | + | ⊔ | — | — | — | 40 | | — | — | — | — | — |
| 5. Schü. | 38 | + + | ⊔ | — | — | — | — | 38 | + + | + | — | — | — | — |
| 6. We. | 42 | — | — | — | — | — | — | 42 | — | — | — | — | — | — |
| 7. Schr. | 38 | + + | + + | ? | — | — | — | 38 | + + + | + + | + | — | — | — |
| 8. Ob. | 40 | | + + + | + + + | — | — | — | 40 | | + + + | + + | + | — | — |
| 9. Bam. | 38 | + + + | + + + | + | + | — | — | 38 | + + + | + + + | + + + | — | — | — |
| 10. Fa. | 41 | — | — | — | — | — | — | 41 | — | — | — | — | — | — |
| 11. So. | 64 | — | — | — | — | — | — | 64 | — | — | — | — | — | — |
| 12. Wz. | 64 | ⊔ | ⊔ | — | — | — | — | 64 | — | — | — | — | — | — |
| 13. Scha | 43 | — | — | — | — | — | — | 43 | — | — | — | — | — | — |
| 14. Str. | 42 | | — | — | — | — | — | 42 | — | + | — | — | — | — |
| 15. Mil. | 41 | | + | ⊔ | — | — | — | 41 | | — | — | — | — | — |
| 16. Fr. | 40 | | ⊔ | — | — | — | — | 40 | | — | — | — | — | — |
| 17. Schra. | 40 | | + + + | + | — | — | — | 40 | | + | + | — | — | — |
| 18. Bet. | 40 | | + + + | + + | + | — | — | 40 | | + + + | + + | ? | — | — |

c) Mit Menschennormalserum.

| Bezeichnung des Stammes | Resultat in Stdn. | Verdünnungen 1 : 5 | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | a) bei Bruttemperatur: | | | | | | |
| 1. Bä. . . . . | 41 | — | — | — | — | — | — | — |
| 2. Me. . . . . | 39 | + + | + | — | — | — | — | — |
| 3. Dös. . . . . | 48 | ⊔ | ⊔ | — | — | — | — | — |
| 4. Br. . . . . | 40 | — | — | — | — | — | — | — |
| 5. We. . . . | 42 | ⊔ | — | — | — | — | — | — |
| 6. Ob. . . . . | 40 | + | — | — | — | — | — | — |
| 7. Fa. . . . . | 41 | + | — | — | — | — | — | — |
| 8. Scha. . . . | 43 | + | — | — | — | — | — | — |
| 9. Str. . . . . | 42 | ? | ? | — | — | — | — | — |
| 10. Mil. . . . . | 41 | ? | — | — | — | — | — | — |
| 11. Bet . . . . | 40 | — | — | — | — | — | — | — |
| | | b) bei 56—58° C: | | | | | | |
| 1. Bä. . . . . | 41 | — | — | — | — | — | — | — |
| 2. Me. . . . . | 39 | + | + | — | — | — | — | — |
| 3. Dös. . . . . | 48 | + | — | — | — | — | — | — |
| 4. Br. . . . . | 40 | ⊔ | — | — | — | — | — | — |
| 5. We. . . . . | 42 | — | — | — | — | — | — | — |
| 6. Ob. . . . . | 40 | + | ? | — | — | — | — | — |
| 7. Fa. . . . . | 41 | + | — | — | — | — | — | — |
| 8. Scha. . . . | 43 | + | — | — | — | — | — | — |
| 9. Str. . . . . | 42 | + | — | — | — | — | — | — |
| 10. Mil. . . . . | 41 | — | — | — | — | — | — | — |
| 11. Bet. . . . . | 40 | — | — | — | — | — | — | — |

**Tabelle X. Agglutinationsversuche mit Antiseren.**

a) Mit Diphtherieserum.

| Bezeichnung des Stammes | Resultat nach Std. | a) Bruttemperatur: Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle | b) 56—58° C: Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 41 | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — | — |
| 2. Me. | 39 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | — | — |
| 3. Dös. | 48 | +++ | +++ | ? | — | — | — | — | — | ++ | + | ? | — | — | — | — | — |
| 4. Br. | 40 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | +++ | +++ | — | — | — | — | — | — |
| 5. We. | 42 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — | — |
| 6. Ob. | 40 | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | ++ | ++ | + | — | — | — | — | — |
| 7. Fa. | 41 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — |
| 8. Scha. | 43 | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — | — |
| 9. Str. | 42 | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — |
| 10. Mil. | 41 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | — |
| 11. Fr. | 40 | + | □ | — | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — | — |
| 12. Schra. | 40 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | — | +++ | +++ | — | — | — | — | — | — |
| 13. Bet. | 40 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

b) Mit Tetanusserum.

| Bezeichnung des Stammes | Resultat nach Std. | a) Bruttemperatur: Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle | b) 56—58° C: Verdünnungen 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Bäch. | 41 | +++ | +++ | ? | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — | — |
| 2. Me. | 39 | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | ++ | ++ | ? | — | — | — | — | — |
| 3. Dös. | 48 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — |
| 4. Br. | 40 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | — | +++ | +++ | +++ | ? | — | — | — | — |
| 5. We. | 42 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | — | +++ | ++ | ++ | — | — | — | — | — |
| 6. Ob. | 40 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — | ++ | ++ | — | — | — | — | — | — |
| 7. Fa. | 41 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | + | ? | — | — | — | — | — | — |
| 8. Scha. | 43 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 9. Str. | 42 | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — | — |
| 10. Mil. | 41 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | +++ | ++ | + | — | — | — | — | — |
| 11. Fr. | 40 | ++ | ++ | + | — | — | — | — | — | + | □ | — | — | — | — | — | — |
| 12. Schra. | 40 | +++ | +++ | + | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| 13. Bet. | 40 | +++ | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

## c) Mit Streptokokkenserum.

| Bezeichnung des Stammes | Resultat nach Stunden | a) Bruttemperatur: Verdünnungen | | | | | | | Kontrolle | b) 56—58° C: Verdünnungen | | | | | | | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 500 | 1 : 1000 | |
| 1. Bäch. | 41 | +++ | +++ | ? | — | — | — | — | — | □ | — | — | — | — | — | — | — |
| 2. Me. | 39 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | — | ++ | + | — | — | — | — | — | — |
| 3. Dös. | 48 | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| 4. Br. | 40 | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — | — | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — |
| 5. We. | 42 | + | □ | — | — | — | — | — | — | +++ | + | — | — | — | — | — | — |
| 6. Ob. | 40 | +++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — | +++ | + | — | — | — | — | — | — |
| 7. Fa. | 41 | +++ | ++ | — | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| 8. Scha. | 43 | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 9. Str. | 42 | +++ | ++ | ? | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — | — |
| 10. Mil. | 41 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — | — |
| 11. Fr. | 40 | □ | ? | — | — | — | — | — | — | □ | □ | — | — | — | — | — | — |
| 12. Schra | 40 | +++ | +++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 13. Bet. | 40 | +++ | + | — | — | — | — | — | — | ? | — | — | — | — | — | — | — |

## Literaturverzeichnis.

1. v. Lingelsheim, Klinisches Jahrbuch 1906, Bd. XV, 2, S. 397, 396, 411, 418. Genickstarreepidemie in Oberschlesien, 1904/05.
2. Bettencourt u. França, Zeitschrift f. Hygiene, Bd. 46, Meningitis cerebrospinalis epidemica, S. 507.
3. Kutscher, Deutsche med. Wochenschrift, 1906, Nr. 46, Ein Beitrag zur Agglutination der Meningokokken.
4. Crendiropoulo et Amos, Semaine médicale, 1907, Nr. 10, Agglutination des vibrions cholériques.
5. Gaehtgens, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt, Bd. 25, Heft I, Beitrag zur Agglutinationstechnik.
6. Kolle u. Wassermann, Klinisches Jahrbuch, 1906, Bd. XV, Heft II, Untersuchungen über Meningokokken.
7. Jochmann, Deutsche med. Wochenschrift, 1906, Nr. 20. Versuche zur Serodiagnostik und Serotherapie der epidemischen Genickstarre.
8. Jacobitz, Zeitschrift f. Hygiene, 1907, Bd. 56, Heft II, Der Diplococcus meningitidis cerebrospinalis als Erreger von Erkrankungen der Lunge und Bronchien, S. 187.
9. Derselbe, Münchener med. Wochenschrift, 1905, Nr. 45.
10. Wollenweber, Klinisches Jahrbuch, 1907. Bd. XVII, 1, Die Genickstarreuntersuchungen in Düsseldorf.
11. Ditthorn u. Gildemeister, Klinisches Jahrbuch, 1907, Bd. XVII, 1, Genickstarreuntersuchungen im hygien. Institut in Posen.
12. Vannod, Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 49, Über Agglutinine und spezifische Immunkörper im Gonokokkenserum.

# Sporenbildung und andere biologische Vorgänge bei dem Bact. anthracis.

Von

Dr. Vladislav Růžička.
Privatdozenten der allgem. Biologie.

Mit Tafel I, II, III.

(Aus dem k. k. hygienischen Institut des Prof. Dr. Gustav Kabrhel in Prag.)

## I. Zur Histologie und Mikrochemie der Sporenbildung bei Bact. anthracis.

Nachdem ich von dem Bact. anthracis den Beweis geliefert habe [1]), daſs sich dasselbe durchgehends aus Nukleinstoffen zusammensetzt, lag die Frage nahe, wie sich zu dieser Tatsache die Produkte der vegetativen bakteriellen Individuen: die Sporen verhalten. Die Bearbeitung dieses Problems erwies sich als eine ziemlich komplizierte Aufgabe.

Bevor ich jedoch an die Beantwortung der gestellten Frage schreite, erlaube ich mir auf zwei neuere Arbeiten hinzuweisen, deren Resultate ich als Bestätigung meiner Behauptung von der Nukleinnatur der Substanz, aus welcher die Milzbrandbakterien bestehen, anzusehen, wohl das Recht habe.

Dietrich und Liebermeister [2]) haben in den Milzbrandbakterien Körnchen beobachtet, welche sich mit Naphthol-

1) Vlad. Růžička, Über die biol. Bedeutung der färbbaren Körnchen des Bakterieninhalts. Arch. f. Hygiene, Bd. XLVII, 1903. — Weitere Untersuchungen über den Bau und die allg. biolog. Natur der Bakterien. Archiv für Hyg., Bd. LI, 1904.

2) Sauerstoffübertragende Körnchen in Milzbrandbazillen. Zentralblatt für Bakter. u. Parasitenkunde. 32. I. Orig. 1902.

blau färbten und welche, der Vermutung dieser Autoren nach, den molekulären Sauerstoff der Luft zu aktivieren haben; auf diese Funktion der Körnchen schlossen sie aus der oberwähnten Tinktion, welche nur bei Sauerstoffzutritt möglich erscheint. Ich mufs jedoch — freilich nur per parenthesin, da mich diese Frage weiter nicht beschäftigt hat — hervorheben, dafs sich die erwähnte Färbung jener Körnchen auch dann eingestellt hat, wenn dieselben durch Hitze abgetötet worden sind.

Sowohl aus der Beschreibung der Autoren, wie auf Grund einer Wiederholung ihrer Versuche meinerseits, glaube ich schliefsen zu dürfen, dafs die von ihnen beobachteten Körnchen mit denjenigen, welche ich als Bestandteile der verschiedensten Protoplasmastrukturen der Bakterien beschrieben habe, identisch sind, freilich — wie ich gleich vorhinein hervorheben will — unter bestimmten Bedingungen.

Mit Bezug auf diese Identifizierung wird es sicherlich von Interesse sein, die Resultate der mikrochemischen Untersuchung der Körnchen, welche die erwähnten Forscher unternommen haben, kennen zu lernen.

Da überrascht mich vor allem das Kommentar, mit welchem Dietrich und Liebermeister die Tatsache, dafs die erwähnten Körnchen durch Einwirkung des Magensaftes nicht verändert werden, begleiten, indem sie zur Konstatierung dieses Umstandes den Zusatz machen: »selbst wenn der ganze Bazillenleib aufgelöst ist, höchstens vielleicht noch die etwas widerstandsfähigere Membran übrig geblieben ist.« Es ist mir nämlich durchaus nicht klar, woraus von den Autoren die vollständige Auflösung des Bakterienkörpers erschlossen worden ist, wenn — wie aus dem Zitate zu ersehen — die angeführten Körnchen und die Membran zugegen waren. Da ich die Netzstrukturen, deren Bestandteil die besprochenen Körnchen bilden, in den der Magenstoffverdauung unterworfenen Bakterien noch am 8. Tage, die übrigen Bestandteile der Bakterien aber noch selbst am 50. Tage der Safteinwirkung vorzufinden vermochte, so mufs ich den Schlufs ziehen, dafs der obenzitierte Ausspruch Dietrichs und Liebermeisters wahrscheinlich nur einer

vorgefafsten Meinung über die zelluläre Natur der Bakterien seine Entstehung verdankt. Dies mein Urteil steht auch mit den Ergebnissen, welche die zitierten Autoren über die Chemie der von ihnen beobachteten Körnchen erzielt haben, in vollkommenstem Einklange. Bezugnehmend auf die letztere, so widersprechen sie vor allem der Behauptung Grimmes, nach welcher die Körnchen Fetttröpfchen sein sollten, trotzdem sie mit Sudan III eine Färbung derselben erzielt haben, indem sie anführen, dafs die letztere auch dann zustande kommt, wenn man die Körnchen mit Äther und Alkohol oder mit Chloroform extrahiert.

Trotzdem halten sie dielben für Reservestoffe, »wenn auch nicht von der gewöhnlichen Art«. Dafs es Nukleine wären, meinen sie nicht, indem sie auf die Unveränderlichkeit der Körner in verdünnten Alkalien, Essigsäure und Monokaliumphosphat hinweisen. Doch geben sie zu, dafs die Substanz jener Körnchen den Nukleinen nahesteht.

Ich werde auf diese Schlufsfolgerung im nachstehenden noch zurückkommen.

Der Ansicht, dafs die in den Bakterien enthaltenen Körner Reservestoffe sind, begegnen wir auch in den Ausführungen von Meyer[1]).

Diesem Forscher zufolge ist es möglich, dafs das Volutin (so benennt er die Substanz jener Körner, welche er aufser bei den Bakterien auch bei einer Reihe niederer Pflanzen konstatieren konnte) zu den Eiweifsstoffen gehört und eine bedeutende Quantität von Nukleinsäureverbindungen enthält. Trotzdem erklärt er die Volutinkörner für Reservestoffe, indem er zugunsten dieser Ansicht anführt, dafs sie sich in keimenden Bakterien gewöhnlich zugleich mit typischen Reservestoffen (Glykogen Fett) vorfinden, dafs ihre Zahl vor der Sporenbildung am gröfsten ist und dafs sie bei derselben geradeso wie Fett und Glykogen verbraucht werden.

1) Orient. Versuche über Verbreitung Morphol. u. Chemie des Volutins. Bot. Ztg. 62, 1904.

Von den Ausführungen Meyers erscheint mir die von ihm festgestellte Tatsache, dafs die besprochenen Körner eine reichliche Menge Nuklein enthalten, von viel gröfserem Werte zu sein, als seine Deutung derselben als Reservestoffe. Denn jene Tatsache stimmt völlig damit überein, was ich über die chemische Zusammensetzung der morphologischen Komponenten der Bakterien in Erfahrung gebracht habe, während für die Deutung der Körner als Reservestoffe Meyer nur Analogien beizubringen in der Lage war, welche freilich mit einem Beweise nicht identifiziert werden können.

Überhaupt scheint mir einer ähnlichen Behauptung vor allem die für das Nuklein charakteristische relative Stabilität des Moleküls im Wege zu stehen. Bekanntlich erleidet das Nuklein der Zellen von einer protrahierten Hungerung ausgesetzten Tieren keine Verminderung[1]).

Was weiterhin die Gegenwart der Nukleinkörner in keimenden Stäbchen, ihre Anhäufung zur Zeit der Sporulation und ihren Verbrauch bei der Ausbildung der Spore anlangt, so können diese Tatsachen im Einklange mit meinen Angaben von den chemischen Verhältnissen der Bakterien erklärt werden, ohne dafs man die erwähnten Körner für Reservestoffe zu halten gezwungen wäre. Aus dem nachstehend Mitgeteilten wird sich im Gegenteil ergeben, dafs dieselben tatsächliche Differenzierungen der lebenden Substanz sind.

Auf Grund des Angeführten kann also als sichergestellt gelten, dafs sämtliche Komponenten des Milzbrandbakteriums Nukleinsubstanzen entsprechen.

Der scheinbare Widerspruch zwischen dieser Behauptung und den Angaben von Dietrich und Liebermeister wird im nachfolgenden seinen Austrag finden.

Es wird also die Frage nicht als überflüssig erscheinen, ob die Substanz der Milzbrandbakterien eine Differenzierung zu erkennen gibt, welche mit Differenzierungen von anderweitigen

1) Nemser, Sur la manière de se comperter des nucleines dans l'inanition des cellules. Arch. de sc. biol. Petersb.

Nukleinsubstanzen verglichen und in Analogie gestellt werden könnten.

Die Entscheidung dieser Frage ist in cytologischer Beziehung von weitreichender Bedeutung, wie ich des näheren auszuführen wohl nicht notwendig habe.

Nach welcher Richtung hin sich meine diesbezüglichen Untersuchungen zu bewegen haben werden, geht aus dem Nachfolgenden hervor.

Es ist sichergestellt worden, dafs in gewissen Lebensabschnitten des Zellkernes das Chromatin der Kernschleifen schwindet. Die Stelle des verschwundenen Schleifenchromatins nimmt sodann ein Liningerüst ein, welches aufser durch seine Unfärbbarkeit mit basischen Farbstoffen, auch durch Unterschiede von ganz zweifellos chemischer Natur dem Chromatin gegenüber charakterisiert ist. Gemeinschaftlich ist den beiden Substanzen die Widerstandsfähigkeit gegen den Einflufs der künstlichen Magensaftverdauung.

Aus dem beschriebenen Vorgange hat man gefolgert, dafs das Linin die Grundsubstanz sei, in welche das Chromatin der Kernschleifen eingebettet ist. Doch kann bei voller Entwicklung des letzteren das Liningerüst morphologisch nicht konstatiert werden, woraus man den weiteren Schlufs zog, dafs das Chromatin dasselbe verdecke.

Es ist jedoch klar, dafs man mit demselben Rechte behaupten könnte, dafs — da das Linin erst nach dem Schwunde des Chromatins oder noch vor der vollen Entwicklung desselben sichtbar wird — dasselbe in das Chromatin und umgekehrt umgewandelt werde.

Lassen wir jedoch diesen Umstand vorläufig beiseite und begnügen wir uns mit der Tatsache, dafs eine morphologische Substituierung der beiden Substanzen vorkommen kann. Dieselbe ist histologisch so prägnant, dafs bereits Haecker die Vermutung ausgesprochen hat, dafs die Bedeutung der persistierenden Chromosomen nicht im Chromatin, sondern im Gegenteil im achromatischen Substrate derselben beruht. Freilich erscheint es mir zweifelhaft, ob man — wie es geschieht — die

chromatinfreien Gebilde noch als Chromosomen bezeichnen darf, da das Chromatin, wie Frank Schwarz gezeigt hat, kein rein morphologischer Begriff ist, sondern auch chemischen Sinn besitzt und zwar einen solchen, der von dem des Linins vielfach abweicht.

Wenden wir uns nun dem Objekte der vorliegenden Publikation zu.

Zum Zwecke meiner Untersuchungen habe ich Milzbrandbakterien auf mit einigen Tropfen Bouillon benetzten Agarplatten gezüchtet, um die Sporulation derselben zu beschleunigen. Von dem auf diesen Platten aufgewachsenen Material brachte ich je einige Platinösen in Uhrgläser, welche mit den notwendigen Reagentien gefüllt waren und zwar so, dafs sich die letzteren der eingebrachten Bakterienmenge gegenüber in grofsem Überschusse befanden. Nach Ablauf von verschiedenen Zeitintervallen wurden sodann aus dem Inhalte der Uhrgläser mikroskopische Präparate gewöhnlich in der Weise angefertigt, dafs ich das Tröpfchen am Objektglase lufttrocken werden liefs, mit der Fixierungsflüssigkeit — als welche ich eine Mischung von gleichen Teilen konzentrierter wässeriger Sublimatlösung und 1 proz. Chromsäure benutzte — übergofs; darauf wurde mit Wasser abgespült, um die herauskristallisierten Reste der zu den Reaktionen gebrauchten Salze zu entfernen und das Präparat auf 17—24 Stunden in die obgenannte Fixierungsflüssigkeit übertragen. Nach Beendigung der Fixation wurde mit Wasser abgespült und zu einem Teile mit 1 proz. wässeriger Fuchsinlösung, zum anderen mit 1 proz. wässeriger Chinablaulösung gefärbt; in einzelnen Fällen kam die Heidenhainsche Hämatoxylinlacktinktion in Verwendung.

Ich habe besonders auf die Wirkung der folgenden Reagentien mein Augenmerk gerichtet: 20 proz. Kochsalz, konzentrierte Lösungen von Magnesiumsulfat, Ferrocyankalium, Kupfersulfat, 5 proz. Lösung von salpetersaurem Natron, 1 proz. und 5 proz. Monokaliumphosphatlösung.

Meine Versuche ergaben das folgende Resultat: Selbstverständlich führe ich nicht alle von mir unternommene Ver-

suche an, sondern nur Beispiele derselben, da die Ergebnisse übereinstimmen.

**20 proz. NaCl-Lösung.**

Dauer der Einwirknng $3^1/_2$ Stunden bei einer Temperatur von ca. 18° C. Die Stäbchen erscheinen vielfach geschwollen, sind in der Regel sehr schlecht färbbar. Die Sporen und andere kleine Körner treten als glänzende, ungefärbte Körper scharf hervor.

Dauer der Einwirkung 5 Tage im Thermostat bei 37° C. Das Präparat enthält sehr wenige ganze Stäbchen. Stellenweise liegen Haufen von intensiv mit Fuchsin färbbaren Körnern, oft liegen die Körnchen so nebeneinander, dafs man daraus schliefsen kann, dafs da ein Bakterium bestanden hat, da die Gruppierung der Körnchen die Form und die annähernden Dimensionen eines solchen bewahren. Wo ein Stäbchen besser konserviert blieb, erscheint die in demselben enthaltene, mit Fuchsin gefärbte Substanz an ihren Rändern unregelmäfsig ausgezackt, wie angenagt. Die Sporen ohne sichtbare Veränderung, gut sichtbar.

**Konz. Lösung von Magnesiumsulfat.**

Dauer der Einwirknng $3^1/_2$ Stnnden. Die Stäbchen sind geschrnmpft, bedeutend enger; obwohl sie sich im grofsen und ganzen ziemlich intensiv färben, vermag man doch einen Abgang der färbbaren Substanz zu konstatieren; einzelne Anthraxfäden sind fast ungefärbt. In den unfärbten Fäden kann an den Innenkörpern ein enger, verschieden breiter, gefärbter Saum beobachtet werden, welche Erscheinung wahrscheinlich mit dem Schwunde der färbbaren Substanz znsammenhängt, indem der Saum den Rest derselben darstellt. Die Sporen sind ungefärbt, von dem üblichen Aussehen.

Dauer der Einwirkung 5 Tage im Thermostat. Die Stäbchen tragen zum Teile Schrumpfung, zum Teile — und dies in der Mehrzahl der Fälle — eine ganz bedeutende Schwellnng zur Schau. Die färbbare Substanz erscheint in Form verschieden intensiv gefärbter Fragmente. Es finden sich Stäbchen vor, welche sich nicht mehr ganz färben, sondern eine Verengung der färbbaren Substanz aufweisen; dieselbe kann auch unebene Ränder zeigen; in anderen sieht man entweder solide oder vakuolisierte Schollen der färbbaren Substanz, welche in Gröfse und Anzahl variieren können. Dabei kann die Färbung der Stäbchen auch verschieden intensiv sein, so dafs man fast normal gefärbten, aber auch nur blafs rosa angehauchten, kaum unterscheidbaren, Schatten derselben begegnen kann, dazwischen aber allen Übergängen. Es kommen auch Stäbchen vor, welche überhaupt keine färbbare Substanz mehr aufweisen. Oft erscheinen sämtliche Individuen mit äufserst feinen, nicht ganz gleich grofsen Körnchen erfüllt. Die Innenkörper, sowie die Sporen heben sich, soweit vorhanden, klar ab. In Stäbchen, welche die färbbare Snbstanz fast gänzlich entbehren, erscheinen die letzten Reste derselben in Form von verschieden starken Hüllen der Innenkörper.

**Konz. Ferrocyankaliumlösung.**

Einwirkungsdauer $3^1/_2$ Stunden. Die Stäbchen sind eher geschwollen und färben sich nur sehr blafs. Die färbbare Substanz erscheint in verschiedener Gestalt; die Sporen sind ungefärbt, gut sichtbar.

Dauer der Einwirkung 5 Tage im Thermostat. Die Stäbchen sind sehr verengt, färben sich stellenweise schlecht, was besonders an mit Karbolchinablau gefärbten Präparaten deutlich zutage tritt.

**Konz. Kupfersulfatlösung.**

Einwirkungszeit $3^1/_2$ Stunden. Die Stäbcheu sind geschrumpft; im übrigen gleicht das Bild demjenigen nach der Ferrocyankaliumwirkung. Die färbbare Substanz gibt verschiedene Gestaltung zu erkennen, angefangen von Einzackungen an den Rändern der Längsseiten bis zur Füllung der Stäbchen mit groben Schollen.

Dauer der Einwirkung 5 Tage im Thermostat. Die schlechte Färbbarkeit ist hier allgemein. Die ungefärbten Sporen heben sich scharf ab.

**5 proz. Lösung von salpetersauerem Natron.**

Dauer der Einwirkung $3^1/_2$ Stunden. Die Stäbchen sind zum Teil geschwollen, zum Teil geschrumpft. Die färbbare Substanz ist in vielen nicht mehr nachzuweisen, in fast allen erscheint sie sowohl der Menge als auch der Färbbarkeit nach reduziert zu sein. Auch hier können die letzten Reste derselben als Hüllen der Innenkörper nachgewiesen werden. Die Involutionsformen zeichnen sich insgesamt durch eine intensivere, ja nahezu normale Färbung aus. Die Sporen ungefärbt, gut sichtbar.

Einwirkungszeit 5 Tage im Thermostat. Die Stäbchen sind gleichfalls teilweise geschwollen, teilweise geschrumpft. Der Abgang der färbbaren Substanz ist durchgehends bemerkbar. In vielen, der diffusen färbbaren Substanz gänzlich entblöfsten Stäbchen sind sehr feine, rötlich (vom Fuchsin?) angehauchte Körnchen enthalten, welche in zahlreichen Individuen zu alveolären oder spiralförmigen Strukturen angeordnet sind. Die ungefärbten Sporen treten deutlich hervor.

**1 proz. Monokaliumphosphatlösung.**

Dauer der Einwirkung $3^1/_2$ Std. Die geschrumpften Individuen enthalten die färbbare Substanz in Form von in der Längsachse der Bakterien gelagerten Stäbcheu, welche unregelmäfsig ausgezackte Ränder aufweisen oder in Gestalt von verschieden grofsen und unregelmäfsig geformten Schollen. Viele Individuen enthalten entweder keine färbbare Substanz oder nur in der allernächsten Umgebung der Innenkörper. Die Involutionsformen lassen auch hier eine intensivere, bis fast normale Färbbarkeit erkennen. Die ungefärbten Sporen sind deutlich wahrnehmbar.

Einwirkungszeit 5 Tage im Thermostat. Die oben angedeuteten Veränderungen sind auch hier iu grofsem Mafsstabe zu konstatieren. Die färbbare Substanz gewinnt durch Unregelmäfsigmachung der Ränder

phantastische Formen, die um so auffallender erscheinen, wenn sie die Hülle der unveränderten Sporen oder Innenkörper bilden. In sporenfreien Fäden ist die Fragmentierung der färbbaren Substanz und zugleich die Verkleinerung der durch diese Fragmentation entstandenen Schollen klar zu konstatieren. In einem fortgeschrittenen Stadium enthalten die Stäbchen bis auf unbedeutende, verschieden grofse Schollchen, Körnchen und auf die Hüllen der Innenkörper nichts von der färbbaren Substanz mehr.

**5 proz. Monokaliumphosphatlösung**

wirkt in analoger Weise wie die vorhergehende Lösung.

Die geschilderten Versuchsergebnisse gestatten nur eine Interpretation und zwar im Sinne des Schwundes der in den Bakterien enthaltenen färbbaren Substanz.

Vergleicht man nun dieses Resultat mit dem über die (mit basischen Farbstoffen) färbbare Substanz der Kerne von pflanzlichen und tierischen Zellen bekannten, so springt sofort das analoge Verhalten beider in die Augen, so dafs man, mit gleichzeitiger Rücksicht auf die übrigen Kongruenzen, zu der Schlufsfolgerung gedrängt wird, dafs sich die färbbare Substanz des Milzbrandbakteriums der Einwirkung der obangeführten Agentien gegenüber in derselben Weise wie das Chromatin der Zellkerne verhält. In diesem Sinne ist das Resultat der zitierten Versuche als eine weitere Vervollständigung meines Beweises, dafs die das Anthraxbakterium zusammensetzende Substanz Kernsubstanz ist, anzusehen.

Von besonderer Wichtigkeit erscheint jedoch der nachfolgende Umstand. Bereits aus der $3^1/_2$stündigen Einwirkung der obzitierten Chemikalien geht nämlich klar hervor, noch klarer aber aus der 5tägigen Einwirkung bei erhöhter (Thermostat-) Temperatur, dafs dieselben auf die mit wässerigem Fuchsin färbbare Substanz und auf die Sporen in verschiedener Weise einwirken. Während nämlich jene Substanz schwindet, bleiben die Sporen unverändert.

Dieser Umstand bietet aber vom cytologischen Standpunkte aus grofses Interesse.

Denn, während nach den von vielen Seiten bestätigten Angaben Frank Schwarz' das Kernchromatin von den obangeführten Agentien aufgelöst wird, bleibt das Linin von denselben unangetastet. Aus dem Umstande, dafs die Sporen von ihnen nicht verändert werden, ergäbe sich — da sie auch der Wirkung des künstlichen Magensaftes nicht unterliegen — der Schlufs, dafs die Sporen aus Substanzen bestehen, welche dem Linin entsprechen.

Es sind nun freilich gegen die Aufstellung des Begriffes »Linin« verschiedene Einwendungen gemacht worden. So wendet z. B. Tellyesniczky[1]) gegen F. Schwarz folgendes ein: »Für die Existenzberechtigung seines Linins suchen wir in seiner Arbeit vergebens irgendein nennenswertes Argument (S. 703).« Trotzdem ist auch Tellyesniczky der Ansicht, dafs das Linin »als eine Transformation des Chromatins erscheint, indem eigentlich Schwarz auf Grund irrtümlicherweise supponierter Lösungen das verschwunden gedachte, in Wirklichkeit aber vorhandene Chromatin mit einem neuen Namen taufte (S. 704)«. Diese Auffassung ist jedoch, wie ich des weiteren zeigen werde, eine irrtümliche. Denn die erwähnten Substanzen differieren in ihren Lebensäufserungen derartig voneinander, dafs von einer Identifizierung in dem Sinne des letztzitierten Ausspruches von Tellyesniczky keine Rede sein kann. Etwas anderes ist freilich — und ich glaube, dafs wohl auch Tellyesniczky ähnliches vorgeschwebt hat, wenn er es auch nicht klar aussprach — ob angenommen werden kann, dafs die beiden früher genannten Substanzen zu jeder Zeit vorhandene Komponenten der Zelle bilden. Und da möchte ich mich, meinen Untersuchungen ein wenig vorgreifend, dahin aussprechen, dafs eine solche Annahme wohl kaum genügend begründet erscheint, jedenfalls aber auf keinen Fall verallgemeinert werden darf; nach meinen Erfahrungen erscheint es mir wohl wahrscheinlicher, anzunehmen, dafs das gleichzeitige Vorkommnis von Linin und Chromatin zwar mög-

1) Zur Kritik der Kernstrukturen. Arch. f. mikr. Anat., 60, 1902.

lich, jedoch keineswegs für alle Zustände des Kernes bewiesen ist, und dafs wir uns mit den jeweiligen Befunden am besten abfinden, wenn wir das Linin als ein physiologisches Umwandlungsprodukt des Chromatins ansehen, dessen Entstehung mit gewissen Funktions- und Lebensvorgängen verknüpft ist. Zugleich möchte ich bemerken, dafs vorausgesetzt werden mufs, dafs die Substanzen, welche in verschiedenen Zellen die Lininreaktion geben, ebenso verschieden sein können und es jedenfalls auch sind, wie die Chromatinsubstanz von Zellen verschiedener Arten.

Wenn ich somit konstatiere, dafs die Sporensubstanz der Bakterien dem Linin entspricht, so ist und soll hiermit natürlich keine analytisch-chemische Charakteristik der Sporen gegeben werden. Die Wichtigkeit dieser Feststellung beruht vielmehr in der Erkenntnis, dafs gewisse, in chemischer Hinsicht bestimmt gekennzeichnete morphologische Gebilde in einem direkten Abhängigkeitsverhältnisse zu anderen in chemischer Hinsicht anders gearteten stehen können, sowie in dem Umstande, dafs dieses Verhalten auf ein allgemeiner gültiges Gesetz hinzuweisen scheint.

Da nämlich die Sporen das Produkt von vegetativen Stäbchen sind, das direkt aus der Substanz der letzteren entsteht, so mufs geschlossen werden, dafs die Sporen durch eine chemische Umwandlung der Chromatinsubstanz der Bakterien zustandekommen. Denn die sporenfreien vegetativen Stäbchen verlieren, wie meine früher angeführten Versuche zeigen, durch die Einwirkung der meisten oben genannten Reagentien völlig ihre färbbare Substanz, so dafs sie wie leer aussehen; durch 20proz. NaCl werden sie sogar gänzlich aufgelöst; somit mufs die dem Kernchromatin entsprechende Substanz bei weitem den Hauptbestandteil derselben ausmachen. Dies ist auch in Ansehung meiner chemischen Analyse des Milzbrandbakteriums, welche einen sehr hohen Nukleingehalt ergab[1]), wahr-

1) Dieses Archiv, Bd. LI, 1904.

scheinlich geworden, sofern man das Chromatin mit dem Nuklein identifiziert. Doch scheint mir das letztere Vorgehen, wiewohl es ziemlich allgemein ist, nicht ganz richtig zu sein, da in der durch Magensaftverdauung bereiteten Substanz nicht nur das Chromatin allein, sondern auch das Linin und das Pyrenin enthalten sein können, Substanzen, welche entschieden, und zwar nicht blofs in morphologischer, sondern auch in chemischer Beziehung, von dem Chromatin unterschieden werden müssen. Auf diese Weise werden wir auf die Bahn einer morphologisch chemischen Untersuchung gedrängt und zwar um so mehr, als es sich immer klarer zeigt, dafs es tatsächlich geformte Gebilde gibt, deren Charakteristik ohne eine bestimmte chemische Kennzeichnung undenkbar wäre, die also einen morphochemischen Begriff bilden (wie ich mir dies zu bezeichnen gestattet habe[1]), und die nur in Ansehung der Unzertrennlichkeit ihrer morphologischen und chemischen Charaktere bestehen und fallen, sobald sich irgendeiner derselben geändert hat.

Eben das Milzbrandbakterium erscheint als ein Objekt, wie man schwerlich ein zweites finden würde, um die vitalen Umwandlungen des Chromatins und die diesbezüglichen morphochemischen Vorgänge daran studieren zu können, die hier in einer von keinerlei störenden Einflüssen komplizierten Reinheit zutage treten.

In welcher Weise die Sporen durch Umwandlung der chromatischen Substanz der Bakterien entstehen, lehren meine weiter unten nachfolgenden Mitteilungen.

Die morphologische Seite der Sporenbildung bedarf trotz der zahlreichen auf diesen Punkt gerichteten Publikationen noch immer einer definitiven Klärung.

Nach dem Vorbilde von Preisz können die Ansichten der Autoren über die Sporenbildung in zwei Hauptgruppen geschieden werden.

Zopf sagte vom Bac. tumescens aus, dafs die Sporen desselben durch Zusammenfliefsen mehrerer im Bazillenleibe auf-

1) In meiner Arbeit: Der morphologische Metabolismus des lebenden Protoplasmas. Archiv f. Entwicklungsmechanik. Bd. 21, 1906.

getauchter Körnchen entstehen. Zehn Jahre später ist Bunge bezüglich des Bact. anthracis zu einem analogen Schlusse gelangt und auch Burchard und Migula haben diese Entstehungsweise für den Bac. subtilis und die Mehrzahl der übrigen sporenbildenden Bakterien akzeptiert.

Im Gegensatze zu dieser Ansicht, nach welcher also zur Sporenbildung das Zusammenfliefsen mehrerer dazu bestimmter »sporogener« Körnchen nötig ist, lehrte aber eine Anzahl von Forschern und zwar zum Teile auf Grund von Untersuchung derselben Objekte, dafs zur Entstehung der Spore ein einziges Körnchen genügt. So behauptete dies de Bary vom Bac. subtilis und Bac. anthracis; dieselbe Genesis führte Klein für Bac. leptosporus und Bac. sessilis aus.

Die eben erwähnte Anschauung gewinnt durch den Umstand an Interesse, dafs zahlreiche neuere, unter Anwendung einer vervollkommneten und sehr verfeinerten Technik ausgeführten Arbeiten, sich derselben in bedeutendem Mafse wieder zuwenden, trotzdem sie von allen Angaben über die Sporenentstehung die älteste ist.

Die gröfste Mehrzahl der neueren Beobachter gibt nämlich an, dafs sich die Spore aus dem Körper des Sporangiums als ein unscharf begrenztes Körperchen »herausdifferenziert«, und allmählich alle für die Spore charakteristischen Eigenschaften acquiriert.

Nach Brefeld, dem wir diese Konzeption verdanken, geschieht bei dem Bac. subtilis die Differenzierung in der Weise, dafs im Sporangium ein dunkler Schatten auftritt; es hat den Anschein, als wenn sich die Substanz des Sporangiums an einer Stelle ansammeln würde.

Somit würde es sich um eine Kondensation des »nichtdifferenzierten« Sporangiumprotoplasmas handeln; eine Schlufsfolgerung, die freilich zu einer wesentlich anderen Auffassung des Sporenbildungsvorganges führen mufs als jene, nach welcher die Spore dem Ineinanderfliefsen anderer körniger Protoplasmadifferenzierungen ihre Entstehung verdankt.

Für die Entstehung der Spore aus einem Korne sprechen die folgenden Daten:

Nach A. Koch tritt bei Bac. carotarum, dessen Inhalt niemals körnige Differenzierungen aufweist, die Spore als ein stärkere Lichtbrechung zeigender Fleck auf.

Peters sah in seinem Bac. ε eine plasmatische Brücke, welche das Licht etwas stärker brach als das übrige Plasma, und welche später durch eine unscharf begrenzte Spore ersetzt wurde, die jedoch bereits die definitive Gröfse hatte.

Bei Bac. Solmsii schwillt nach den Angaben von Klein ein Polende an und nimmt eine grünliche Färbung an. Der Inhalt des geschwollenen Polendes kontrahiert sich später, löst sich von der Wand des Sporangiums ab und zeigt anwachsendes Lichtbrechungsvermögen.

Den Mitteilungen von Frenzel gemäfs erhält der grüne Kaulquappenbazillus in der Mitte des Sporangiums einen grofsen ovalen Körper, der etwas kleiner als die fertige Spore ist, grünlich wird und sich auch amitotisch teilen kann. Woher derselbe herrührt, vermochte Frenzel nicht zu eruieren — »er ist mit einem Male da«.

An älteren Milzbrandbakterien kann nach A. Fischer konstatiert werden, dafs die Spore durch Kontraktion des Inhaltes zustandekommt, der im Beginne noch völlig den Bau des vegetativen Stäbchens besitzt. Die solchermafsen hervorgebrachte Sporenanlage kontrahiert und verdichtet sich später noch mehr, um die reife Spore hervorzubringen.

Die Publikation A. Meyers bezieht sich auf den Bac. tumescens und Bac. asterosporus. Am Beginne der Sporenbildung schwillt das Sporangium an und im Cytoplasma tritt eine helle, elliptische, mit einer etwas dichteren Membran versehene Stelle auf, die Meyer als Sporenvakuole[1]) bezeichnet.

Dieselbe wird später stark lichtbrechend und scheidet sich scharf ab. Das Protoplasma konzentriert sich um die Spore

1) Per parenthesin — eine gänzlich unzutreffende Bezeichnung, da von einem »vacuum« absolut keine Rede sein kann. Dieser Name ist ebenso schlecht wie derjenige der nur zu oft angewendeten »Kernvakuole«.

herum, wodurch die letztere kleiner wird. Schliefslich erlangt die Spore eine dünne Hülle und ein Ektosporium.

Wagner beobachtete in Typhus- und Koli-Bazillenketten liegende Sporen. Dieselben besafsen Bakteriengröfse und nahmen den Platz derselben ein; sie unterschieden sich von den Bakterien blofs dadurch, dafs sie ungefärbt waren. Wagner schlofs daraus, dafs die Spore eine Bakterienzelle sei, welche sich zu Schutzzwecken mit einer starken Membran versehen hat.

Bedeutende Aufmerksamkeit haben ihrerzeit die Angaben von Nakanishi hervorgerufen. Da dieselben jedoch vor allem auf der Konstatierung von Gebilden in Bakterien beruhen, welche er für Kerne ansah, so werde ich später auf dieselben zu sprechen kommen. Soviel sei jedoch an dieser Stelle hervorgehoben, dafs auch nach Nakanishi die Spore durch Verdichtung des Plasmas um ein Körnchen gebildet wird.

Dasselbe ist auch von den Angaben Preisz' anzuführen, die ich bei der Diskussion der feineren Struktur der Spore besprechen werde.

Die Entwicklung der Ansichten über die Bildung der Spore kann also kurz in folgender Weise charakterisiert werden:

Man hat die Beobachtung gemacht, dafs vor dem Auftreten der Spore im Sporangium Protoplasmakörnchen erscheinen, welche im Laufe der weiteren Entwicklung der Spore entweder nicht mehr oder in geringerer Anzahl vorgefunden werden. Aus diesem Umstande schlofs man, dafs die Sporensubstanz aus den verschwundenen Körnchen gebildet worden ist. Anderseits hat man die Beobachtung gemacht, dafs ein Protoplasmakorn (oft bereits von der Gröfse der definitiven Spore) durch Änderung des Lichtbrechungsindexes sich zur Spore umwandeln kann. Beide Vorgänge werden öfters für dieselbe Bakterienart verzeichnet, was auch von dem Bact. anthracis Geltung hat.

Die nachstehenden Untersuchungen werden ergeben, ob und in welcher Weise diese beiden Beobachtungen zu einem einheitlichen Gesamtbilde der Sporenbildung vereint werden können.

Erinnert man sich der Angaben von Dietrich und Liebermeister über die chemische Zusammensetzung der mit dem Naphtholblau färbbaren Granula des Bakterienleibes, so findet man, die freilich negativen, Kennzeichen, dafs sie durch die folgenden Reagentien: 5proz. Kalilauge, 10proz. Mononatriumphosphat, verdünnte Essigsäure, Eisessig und Magensaft — nicht verändert werden.

Um festzustellen, wie sich diese Körnchen in Präparaten von Milzbrandbakterien verhalten, welche der Einwirkung von chromatinolytischen Stoffen ausgesetzt worden waren, habe ich die Färbung mit Dimethylparaphenylendiamin + $\alpha$-Naphthol an Bakterien vorgenommen, welche 5—6 Stunden in 5proz. salpetersaurem Natron, konz. Kupfer- und Magnesiumsulfat, konz. Ferrocyankalium oder 20proz. NaCl verweilt haben, da ich die Feststellung gemacht habe, dafs nach Verlauf dieser Zeit die Chromatinolyse schon stark fortgeschritten ist.

Es zeigte sich, dafs die solchermafsen präparierten Bakterien — aus gewöhnlichen Agarkulturen — einige Partien enthalten, welche sich mit dem Naphtholblau färben und zwar: kugelige, beliebig gelagerte und in verschiedener, jedoch nicht beträchtlicher, Anzahl auftretende Körnchen, weiterhin die Innenkörper, die letzteren in der Weise, dafs das Ektogranulum meistens — manchmal bedeutend — schwächer gefärbt erschien als das meistens intensiver gefärbte Entogranulum; schliefslich nahm ich auch eine mittelstarke bis schwächere Färbung der Sporen wahr, welche sowohl in Stäbchen eingeschlossene, als auch freie Sporen betraf.

Da eine weitere Verfolgung dieser Verhältnisse (d. h. der mit der mikrochemischen Untersuchung verbundenen Naphtholfärbung) ein tieferes Eindringen in die Art der Sporenbildung versprach, als es bis jetzt möglich gewesen, so habe ich Versuche vorgenommen, bei welchen ich die Naphtholblautinktion mit der Fuchsinfärbung zur gleichzeitigen Anwendung gebracht habe.

Dabei ging ich in der Weise vor, dafs ich eine 1proz. Wasserlösung von Fuchsin in dünner Schicht auf einem Teile

des Deckglases eintrocknen liefs, auf einen anderen Teil aber je einen nicht zu kleinen Tropfen Dimethylparaphenylendiamin und α-Naphthol brachte, die ich unter gleichzeitigem Zusatze eines Kulturteilchens so vermischte, dafs der gebildete Tropfen auf die trockene Fuchsinschicht hinüberreichte und dieselbe auflöste. Sodann brachte ich das Deckgläschen auf einen ausgehöhlten Objektträger, damit die Luft Zutritt hätte.

Ganz wie ich erwartet habe, stellte sich bei vielen Bakterien eine Doppelfärbung ein. Und zwar färbten sich: die Umrisse des Bakteriums, die Zwischenwände unvollkommen abgetrennter Bakterien, die Netzstrukturen der Bakterienkörper und die Ektogranula in rotem, die Entogranula und in gewissen Kulturen grofse, sporenähnliche Körper, aufserdem noch eine Anzahl von Granula in blauem Tone.

Dieses Resultat meiner Benutzung jener zwei Färbungsverfahren gab Hoffnung, dafs es auf diesem Wege möglich sein wird, die Wandlungen festzustellen, denen die einzelnen different gefärbten Teile im Laufe der Sporenentwicklung unterliegen.

Aus der kongruenten Färbung der Sporen und der nach dem Verfahren von Dietrich und Liebermeister färbbaren Körnchen, die sich aus meinen Versuchen ergeben hat, weiterhin aus dem kongruenten Ausfalle der chemischen Reaktionen bezüglich dieser beiden Gebilde, den ich schon früher erwähnt habe, schien nämlich hervorzugehen, dafs die Aufmerksamkeit vor allem auf die Verfolgung der Schicksale der mit Naphtholblau färbbaren Körner zu richten wäre.

Mit Bezug darauf habe ich vor allem daran zu erinnern, dafs sich in keimenden Sporen nach Preisz [1]) ein mit Fuchsin färbbares Körnchen befindet, welches dieser Autor als den Sporenkern ansieht, und das sich mit einer bestimmten Menge Plasma von dem übrigen Stäbchen an einem der Pole durch eine Zwischenwand absondert. Dieser Kern verschwindet jedoch in der Sporenanlage, wobei sich die letztere in einem bestimm-

1) Preisz, Studien über Morph. u. Biol. d. Milzbrandbaz. Zentralblatt f. Bakter., I, 35, 1904.

ten Zeitpunkte dunkler färbt als der übrige Bazillus; darauf erlischt die Tinktionsfähigkeit derselben und zugleich wird die Substanz der Anlage stark lichtbrechend und glänzend, dabei grenzt sie sich immer schärfer ab.

Von den Sporen des Milzbrandbakteriums hat bereits lange vor Preisz Catterina[1]) auf Grund einer speziellen Tinktionsmethode die Angabe gemacht, dafs sie ein färbbares Körnchen, seiner Deutung nach gleichfalls den Kern, enthalten, das sich bei der Keimung direkt teilt.

Eine ähnliche Angabe finden wir bei Meyer[2]) bezüglich des Bac. asterosporus und auch bei Mühlschlegel[3]).

Darüber, ob die von Catterina und Preisz beobachteten Körnchen in den Sporen des Milzbrandbazillus Kerne sind, kann nunmehr auf Grund meiner Arbeiten ein definitives Urteil, und zwar in negativem Sinne, abgegeben werden, was aus dem Verhalten der Bakterien und Sporen gegenüber der künstlichen Magensaftverdauung hervorgeht.

Diese Erkenntnis macht eine andere Deutung des färbbaren Kornes der Sporen zur Notwendigkeit.

Diesbezüglich haben wir vor allem die nachstehenden Umstände, auf welche bereits Preisz aufmerksam gemacht hat, im Auge zu behalten:

I. Selbst in den jüngsten Sporenanlagen ist »der Kern« oder, wie ich ihn besser bezeichnen will: das Chromatinkorn, stets schon enthalten und erreicht daselbst manchmal Dimensionen, welche »der Kern« des Bakteriums selbst nie erreicht. Preisz gibt selbst zu, dafs er nicht imstande war, den Übertritt des »Bakteriumkernes« in die Spore direkt zu beobachten, sondern dafs er auf einen solchen blofs aus der Ähnlichkeit beider

1) Ric. sull'intima struttura delle spore dei batteri. Atti della Soc. veneto-trent., III., 1898.

2) Studien über d. Morphol. u. Entwicklungsgesch. d. Bakterien. Flora, 1897.

3) Studien über Bildung u. Bau d. Bakteriensporen. Zentralblatt für Bakter., II, Bd. 6, 1900.

und aus dem Umstande schlofs, dafs Bakterien mit Sporenanlage den »Kern« oft nur in dieser Anlage, nicht aufserhalb derselben, besitzen.

II. Zu beachten ist, dafs in der Spore späterhin kein »Kern« mehr nachgewiesen werden kann. Preisz glaubt dies in der Weise erklären zu dürfen, dafs der »Kern« von dem färbbaren Plasma der Sporenanlage entweder verdeckt sein kann, oder dafs es in der Entwicklung des Kernes eine Periode geben kann, in welcher die üblichen Färbungsmethoden zur Kenntlichmachung derselben nicht genügen.

III. Schliefslich mufs hervorgehoben werden, dafs in der keimenden Spore das in der reifen und freigewordenen Spore abwesende Chromatinkorn wiederum leicht nachgewiesen werden kann.

Es ist klar, dafs diese drei Tatsachen ein schweres, wenn nicht überhaupt unlösbares Rätsel bilden, solange man auf dem Boden der zellulären Theorie der Bakterien stehen bleibt. Es ist jedoch interessant, dafs Forscher, die aufserstande sind sich vorzustellen, dafs es ein kernloses Protoplasma geben könnte, bei den Sporen zur Anerkennung einer Ausnahme gezwungen sind. Man kann sich nämlich der Tatsache nicht verschliefsen, dafs es nicht möglich ist, in der reifen Spore ein Gebilde nachzuweisen, das man für den Kern zu halten berechtigt wäre.

Die Spore erscheint als ein Protoplasma, das allen Theorien zum Trotze ein, wenn auch minimales, so doch ganz unzweifelhaftes Leben ohne jeden Kern zu führen imstande ist und zwar eine Zeit hindurch, welche der Lebenslänge eines vegetativen, nach jenen Autoren mit einem Kerne versehenen, Individuums gegenüber, als in Potentia unendlich länger bezeichnet werden mufs.

Die Anhänger der Zelltheorie der Bakterien sind mit Hinblick auf die Tatsache, dafs die Spore zuerst einen Kern besitzt, ihn dann nicht mehr besitzt, während er in der keimenden

Spore wieder auftaucht, — sofern sie sich nicht gewaltsamen Deutungen zuwenden wollen — zu der Anerkennung gezwungen, dafs in diesem Falle der Kern während des Lebens schwindet und später wieder auftaucht, eine Tatsache, die für andere Zellen bestritten worden ist, obwohl sie auch für diese unter bestimmten Bedingungen nachgewiesen werden kann.

Für mich stehen nun zwar die Dinge — sofern es die Sporen betrifft — freilich anders. Da infolge meines Beweises der Kernnatur der Strukturkomponenten des Milzbrandbakteriums von einer Morpholyse und Morphogenese eines Kernes keine Rede sein kann, so ist es klar, dafs es sich in dem vorliegenden Falle nur um den einen Ausdruck des morphologischen Metabolismus des Protoplasmas, bestimmter ausgedrückt, um einen Fall von Umwandlung des Chromatins in eine chemisch unterschiedene und gleichzeitig morphologisch andersgeartete Substanz handeln könne. Aus meinen oben gemachten Äufserungen geht hervor, dafs diese Substanz dem Linin analog ist.

Bei Verwendung der oben dargelegten Doppelfärbung mit Fuchsin und Naphtholblau kann Schritt für Schritt gezeigt werden, dafs der Sporenbildung ein Anhäufen von Chromatinkörnchen auf dem fertilen Pole vorausgeht. Diese Feststellung stimmt mit den früher zitierten Angaben Meyers von der Anhäufung der »Volutin«körner in den vegetativen Stäbchen vor der Sporenbildung[1]) überein.

Die Chromatinkörnchen sondern sich weiterhin von dem übrigen Bakterienkörper vermittelst einer Zwischenwand ab; dieselbe entsteht gewöhnlich in der Weise, dafs sich ein Körnchen in die Länge zieht und zu einer Membran ausbreitet. In einem bestimmten Augenblick dieses Vorganges kann das Bild den Eindruck hervorrufen, dafs — wie z. B. Preisz angibt — das Körnchen von der Scheidewand passiv mitten entzweigeteilt wird. Steht man auf dem Standpunkte, dafs dieses Körnchen dem Bakterienkerne entspricht, so könnte das erwähnte Bild die

1) Siehe auch Mühlschlegel, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 6, 1900.

Deutung erfahren, dafs es sich um eine passive Zerteilung des Kernes handelt. Meinen Beobachtungen gemäfs ist dem jedoch nicht so; es würde auch allen unseren Vorstellungen von der Rolle des Kernes bei der Teilung widersprechen, wenn er in passiver Weise geteilt werden sollte.

Ist die Sporenanlage einmal abgesondert, so kommt es zur Auflösung der in derselben angehäuften Chromatinkörnchen; dieselben zergehen und fliefsen zusammen. Dieses Stadium entspricht demjenigen, in welchem die Sporenanlage stark färbbar erscheint.

Es ist eben dasjenige Stadium, welches mehrere Forscher bewogen hat, die Bakterienspore im morphologischen Sinne mit dem Zellkerne zu analogisieren. So sprach sich Frenzel[1]) darüber in folgendem Sinne aus: »Beginnt mithin die Spore als ein kernartiger Körper, so werden allmählich die Bestandteile der gesamten Zelle in sie aufgenommen, morphologisch ist nun die Spore wahrscheinlich wohl ein Kern.«

Dem analogen Gedanken begegnen wir neuerdings bei Schaudinn[2]). Er fand bei Bac. Bütschlii, dafs sich zur Zeit der Sporenbildung die früher regellos im Bakterienleibe zerstreuten Nukleinkörnchen zu einem zentralen, wellig verlaufenden Faden gruppieren, dessen Enden zu eiförmigen Gebilden anwachsen.[3]) Das ganze Gebilde macht den Eindruck eines Kernes. »Ich habe die Vorstellung«, sagt Schaudinn, »dafs die Kernsubstanzen, welche schon bei höheren Mikroorganismen (vielleicht auch bei anderen Bakterien im Zentralkörper Bütschlis) in einem morphologisch differenzierten Gebilde, dem Zellkern, eine bestimmte Gruppierung und Organisation angenommen haben, bei unserem Bazillus während des gröfsten Teiles seines

1) Der Zellkern und die Bakterienspore. Biolog. Zentralblatt, 1891. — Über den Bau u. die Sporenbildung grüner Kaulquappenbazillen. Zeitschr. f. Hyg., I, 1892.

2) Beitr. z. Kenntnis d. Bakterien u. verwandt. Organismen, I. Bacillus Bütschlii. Arch. f. Protistenkunde, I., 1902. — II. Bacillus sporonema. Ibid. II, 1903.

3) Dieselben verlieren später ihre Tinktionsfähigkeit und wandeln sich zu Sporen um.

Lebens diffus durch das Plasma verteilt sind; nur bei der Sporenbildung kommt es zur Ausbildung eines den echten Zellkernen der höheren Organismen vergleichbaren Gebildes; ich meine die erste Anlage der Spore, die morphologisch einem einfachen Zellkern, wie wir ihn von vielen Protisten kennen, aufserordentlich ähnlich ist. Also nur für eine kurze Lebensperiode kommt es zur morphologischen Sonderung von Kernsubstanz (in Form eines Zellkernes) und Protoplasma.«

Der in dem letzten Satze ausgesprochenen Ansicht Schaudinns wurde freilich durch meine mikrochemischen Untersuchungen für das Bact. anthracis völlig der Boden entzogen, indem ich bewiesen habe, dafs sich Bakterienleib und Spore gegenüber der künstlichen Magensaftverdauung zwar gleich, den chromatinolytischen Stoffen gegenüber aber verschieden verhalten, so dafs beide zwar aus Kernsubstanz bestehen, jedoch der Leib dem Chromatin die Spore dagegen dem Linin entspricht.

Aus diesem Sachbestande ergibt sich somit, dafs die Vermutung von Frenzel und Schaudinn, betreffend die Analogisierbarkeit der Spore mit dem Zellkerne, dahin richtigzustellen ist, dafs die Sporenanlage auf einem bestimmten Stadium ihrer Entwicklung eine Anhäufung von Chromatinsubstanz darstellt.

Nach Erreichung dieses Stadiums schwindet die Färbungsfähigkeit der Sporenanlage.

Es ist von mehreren Seiten die Ansicht ausgesprochen worden, dafs an dem Schwunde der substantiven Tinktionsfähigkeit mit basischen Farbstoffen auch die Innenkörper beteiligt sind.

Auf diese Beteiligung könnten z. B. auch die Angaben von Mühlschlegel (l. c.), Nakanishi[1]) und Ascoli[2]) über die Zusammenwirkung von Plasma und Körnchen bei der Sporenbildung zurückgeführt werden. Nach diesen Autoren soll nämlich nach dem Auftreten der sporogenen Körnchen ein grauer Fleck im Plasma entstehen, um den sich die ersteren zusammendrängen, und mit dem sie verschmelzen. Dieses Stadium

1) Nakanishi, Münch. med. Wochenschr., Nr. 20, 1900.

2) Ascoli, Deutsche med. Wochenschr., Nr. 20, 1901.

kann insofern färberisch festgestellt werden, als die Sporenanlage während desselben sich bei der gewöhnlichen Sporendoppelfärbung im Mischtone des verwendeten roten und blauen Farbstoffes tingiert. Diese Färbung ist jedoch so vieldeutig, dafs sie einen präziseren Schlufs auf die Bildungsweise des gefärbten Elementes wohl kaum zuläfst.

Welche Art der Beteiligung an der Sporenbildung man dem Innenkörper zugeschrieben hat, geht aus den nachfolgenden Momenten hervor.

Bunge[1]) hat den von ihm entdeckten säurefesten Körper, der nach ihm durch Zusammenfliefsen kleiner säurefester Körnchen entsteht, als »Vorspore« bezeichnet. Ich habe das Ektogranulum des Innenkörpers mit diesem säurefesten Gebilde identifiziert.

Krompecher[2]) sprach die Vermutung aus, dafs die von ihm entdeckten, von mir als Entogranula des Innenkörpers bezeichneten Körnchen in irgendwelchen Beziehungen zur Sporenbildung stehen. Er schlofs dies daraus, dafs er die Entogranula nur bei sporenbildenden Bakterien vorfand, dafs sich dieselben der Hitze gegenüber als resistent erwiesen, dafs sie gleichzeitig mit den Entogranula vorkommen und sich gleichzeitig zu Körnchenhaufen umwandeln, wenn die Entogranula sich zu diffus färbbaren Schollen von fast derselben Gröfse neubilden.

Preisz[3]) hat die beiden eben zitierten Meinungen in der Weise zu vereinigen gesucht, dafs er das Entogranulum direkt an der Bildung der Spore teilnehmen läfst, während das Entogranulum nach ihm einen Reservestoff darstellt, »der irgendwie, keinesfalls aber förmlich zum Aufbau der Spore verwendet wird«.

Hierzu habe ich vor allem zu bemerken, dafs die Deutung Preisz' von fixierten Präparaten herauskombiniert wurde, aber keineswegs auf direkter Beobachtung beruht; Preisz hebt selbst, wie ich ja schon einmal erwähnt habe, nachdrücklich hervor, dafs

1) Über Sporenbildung bei Bakterien. Fortschritte der Medizin, 1895.

2) Untersuch. üb. d. Vorh. metachromat. Körnchen bei sporentragenden Bakterien. Zentralbl. f. Bakter., I, Bd. 30, 1901.

3) a. a. O.

er den Übergang vom Zellkern zum Kern der Sporenanlage direkt nicht verfolgen konnte.

Aus seiner Angabe, dafs der »Bakterienkern« in enger Beziehung zu den Scheidewänden steht. welche die Sporenanlage gegen die Mutterzelle abgrenzen, indem er meint, dafs Kernteilung und Scheidenausbildung in einem vor sich gehen können; aus seiner Angabe weiterhin, dafs das in die Spore gelangte Kernteilungsprodukt zu sonst ungewöhnten Dimensionen anwächst, sowie aus seiner Mitteilung, dafs sich diese Gebilde mit verdünnter Fuchsinlösung tingieren, glaube ich schliefsen zu dürfen, das Preisz bei seiner Deutung des Anteiles der Innenkörper an der Sporenbildung verschiedene Gebilde zusammengeworfen hat, woran die von ihm gebrauchte Beobachtungsmethode schuld trägt.

Ich habe [1] des öfteren direkt beobachten können, wie sich ein mit Methylenblau färbbares, im Inhalt eines grofsen Kokkus befindliches Körnchen zu einer Scheidewand umgebildet hat. Ähnliches sah ich später auch bei Bakterien. Die betreffenden Körnchen zeigten sich in keiner Weise von den übrigen in jenen Bakterien enthaltenen Körnchen verschieden. Die Färbbarkeit in Fuchsin kann man gleichfalls als kein derartig charakteristisches Merkmal ansehen, dafs man auf demselben die Diagnose auf den Bakterienkern basieren könnte. Und dies zwar schon auch aus dem Grunde nicht, weil überhaupt die färbbaren Körnchen des Bakterieninhaltes zum gröfsten Teil das Fuchsin wegen seiner, ihrem Porenvolum adäquaten Molekulargröfse, anderen, gleichfalls basischen Farbstoffen, ganz besonders aber dem viel dunkleren Methylenblau, vorziehen.[2] Meine Meinung geht somit dahin, dafs die von Preisz von fixierten Präparaten abgeleitete Beteiligung des Entogranulums an der Bildung der Spore einfach auf die Einbeziehung der im Bakterienleibe enthaltenen Nukleinkörnchen in die Sporenanlage

1) Über die biolog. Bedeutung der färbbaren Körnchen des Bakterieninhaltes. Arch. f. Hyg., 47, 1903.

2) Siehe hierüber meine Arbeit: Weitere Untersuch. über d. Bau u. die allg. biol. Natur der Bakterien. Arch. f. Hyg., 51, 1904.

zurückzuführen ist. Damit will ich aber keineswegs gänzlich in Abrede stellen, dafs das Entogranulum sich an der Sporenbildung doch beteiligt. Habe ich doch ja selbst gesehen, dafs man manchmal bei Anwendung der Doppelfärbung mit Naphtholblau und Fuchsin in der rot gefärbten Sporenanlage ein blaugefärbtes Korn sehen kann, was man so auffassen könnte, dafs dieses Korn dem Entogranulum (das sich gleichfalls mit Naphtholblau färbt) entspricht.

Da jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, dafs das blaue Korn auch nur der Ausdruck der beginnenden chemischen Umwandlung der Sporenanlage sein könnte, so mufs ich die Frage der Beteiligung des Entogranulums an der Sporenbildung offen lassen.

Dafs die Innenkörper sich bei derselben auflösen, geht daraus hervor, dafs sie in den Resten der Bakterienkörper nicht nachgewiesen werden können.

In einem bestimmten Zeitpunkte ist die Färbung so weit zurückgewichen, dafs nur noch ein Chromatinkorn in der Spore vorhanden ist — es ist dann die »gekernte Spore« der Autoren.

Sobald einmal die Färbbarkeit der Sporenanlage erloschen ist, erweisen sich die chromatinolytischen Stoffe bei mikrochemischen Reaktionen als unwirksam, die Spore gibt nunmehr die Reaktionen des Linins. Aus dieser Beobachtung mufs mit Notwendigkeit gefolgert werden, dafs hier zugleich mit dem morphologischen ein chemischer Vorgang stattgefunden hat. Nach Erreichung dieser Entwicklungsstufe ist es nicht mehr möglich, in der Spore ein Chromatinkorn nachzuweisen.

Aus der unfärbbaren[1]) Lininspore sehen wir dann bei der Keimung wiederum das Chromatin entstehen. Es ist klar, dafs es sich hierbei um das Wachstum des Chromatins aus den ultramikroskopischen Dimensionen eines Molekülkomplexes über die Grenze des Auflösungsvermögens des Mikroskopes hinaus, so dafs es in Form eines, sofort mit dem Fuchsin färbbaren Körnchens sichtbar wird, und in der Folge um eine weitere Ver-

1) Natürlich nur in relativem Sinne.

mehrung desselben handelt, bis das aus der achromatischen Lininspore entstandene Stäbchen zum gröfsten Teil wieder aus Chromatin besteht.

Wie man sieht, so bringt diese meine Auffassung alle Umstände, welche von verschiedenen Seiten zur Morphologie der Sporenbildung beigebracht worden sind, in Einklang und stellt den Vorgang der Sporenbildung in morphologischer Beziehung zu anderen an Zellkernen beobachteten Vorgängen in Analogie. Aus dieser Analogie scheint hervorzugehen, dafs die Fähigkeit des Chromatins, sich in das Linin umzuwandeln, auf ein morphochemisches Gesetz von allgemeiner Gültigkeit hinweist. Die allgemeinere Verbreitung dieses Vorganges nachzuweisen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

## II. Das verschiedene Verhalten des Bact. anthracis auf Agar-Agar und Glyzerin-Agar-Nährboden.

Beobachtet man das Wachstum des Milzbrandbakteriums auf gewöhnlichem Agarnährboden, so bemerkt man, dafs der sich bildende Belag nach einiger Zeit ein feuchtes, weifslich graues durchscheinendes Aussehen gewinnt; dagegen wird der auf dem Glyzerin-Agarnährboden sich entwickelnde Belag nach einiger Zeit undurchsichtig und nimmt eine milchweifse Farbe an, zugleich wird er aber auch trockener.

Bei Berührung erweist sich der auf gewöhnlichem Agar aufgewachsene Belag viscös, bis brei-, ja selbst gallertartig, der Glyzerin-Agarbelag im Gegenteile als auffallend brüchig.

Da diese Unterschiede im äufseren Aussehen der Kultur nun auf Unterschieden im Wachstum der Bakterien beruhen können, so habe ich derartige Kulturen einer mikroskopischen Untersuchung unterworfen.

Zu diesem Zwecke fixierte ich die möglichst schnell trocken gelegten Präparate mit einem Gemische von zwei Teilen konz.

wässeriger Sublimatlösung und einem Teil absol. Alkohol und färbte nach Abspülen mit destilliertem Wasser mit verdünnter wässeriger Fuchsinlösung. Diese Präparationsmethode gilt für alle nachstehenden Schilderungen, sofern nicht ausdrücklich anders bemerkt ist.

Ich habe in Erfahrung gebracht, dafs das Wachstum des Milzbrandbakteriums auf den obgenannten Nährböden in verschiedener Weise verläuft.

Ohne mich weiter in die Schilderung dieser Unterschiede an dieser Stelle einzulassen, möchte ich nur das Eine hervorheben, dafs nämlich auf dem Glyzerinagar das Wachstum unseres Bakteriums ein viel üppigeres ist als auf dem gewöhnlichen Agar. Aus dem Aussehen der Kultur kann man diese Tatsache sehr oft nicht erschliefsen. Der Grund mag darin liegen, dafs wir nicht imstande sind, die auf die Nährböden verimpften Teile genau gleich grofs abzumessen, und weil wohl die Menge der wirklich lebenden und vermehrungsfähigen Individuen in den verimpften Kulturteilchen nicht immer gleich ist.

Dagegen tritt der oberwähnte Unterschied im Wachstum auf den beiden Nährböden im mikroskopischen Präparate sehr deutlich zutage.

Aus dem Studium derselben ergibt sich, dafs die Kultur auf gewöhnlichem Agar aus dünnen, schlanken Individuen zusammengesetzte Fäden birgt, während die Glyzerinagarkultur bedeutend voluminösere Individuen aufweist. Wenn man von den ersteren drei der Breite nach nebeneinandergelegte Individuen auf einem Intervalle des mikrometrischen Okulars unterbringt, so gelingt uus dasselbe nur bei 2—2,3 Individuen der Glyzerinagarkultur. Das sind freilich Durchschnittsdaten. Während aber die Agarkulturindividuen in ihren Dimensionen fast gar nicht schwanken, tritt bei den Glyzerinagarkulturindividuen eine ziemlich bedeutende Variabilität der Dimensionen zutage, indem viele derselben zu einer Vergröfserung ihres Volumens hinneigen.

Nach einiger Übung erkennt man bei normalen Kulturen im Mikroskope auf den ersten Blick, ob das Präparat einer

Agar- oder einer Glyzerinkultur entstammt. Der erwähnte Wachstumsunterschied ist eine konstante Erscheinung. Dieselbe mufs jedoch nicht gleich in den ersten Stunden, ja selbst Tagen der Kultivierung jedes Milzbrandstammes offenbar werden. In manchen Kulturen tritt er erst am dritten Tage in Erscheinung, um sich nicht mehr zu verwischen. Manchmal genügt es, eine derartige Kultur auf einen neuen Nährboden zu bringen, um den fraglichen Unterschied gleich in den ersten 18 Stunden zu Augen zu bekommen.

Die besprochene Wachstumsdifferenz mag unerheblich erscheinen; sie ist zum Ausgangspunkt der nachstehend mitgeteilten Beobachtungen und Versuche geworden.

Ich möchte daher vor allem konstatieren wollen, was der Grund jenes Wachstumsunterschiedes ist.

Die betreffenden Nährböden differieren nur darin, dafs derjenige Nährboden, auf welchem das Milzbrandbakterium mächtigeres Wachstum zeigt, eine bestimmte Quantität (7 %) Glyzerin enthält.

Es ist mir nicht bekannt, dafs jemand über die Wirkungsweise dieses Zusatzes auf die Wachstumsweise der Bakterien spezielle Versuche angestellt hätte; derselbe wurde zuerst von Koch vorgeschlagen und verwendet, um den Tuberkelbazillus zu üppigerem Wachstum zu bringen. Dasselbe wird auch bei einer Reihe anderer Bakterien erreicht und — wie aus dem Obigen zu ersehen ist, trifft es auch bei dem Milzbrandbakterium zu.

Nach den landläufigen Gesetzen der Logik liegt der Schlufs nahe, dafs das Glyzerin in irgendwelcher Weise die Assimilation des Bact. anthracis unterstützt oder erhöht. Ob dies direkt oder indirekt geschieht, berührt uns wenig; wichtig ist für uns die Schlufsfolgerung, dafs das Glyzerinagar für das Milzbrandbakterium einen vorteilhafteren Nährboden darstellt, welcher demselben eine regere und wirksamere Assimilation ermöglicht.

## III. Die Differenzen im Entwicklungszyklus des Milzbrandbakteriums bei der Züchtung auf Agar- und Glyzerin-Agar-Nährböden.

Vergleicht man die Art und Weise, in welcher sich das Milzbrandbakterium auf den erwähnten Nährböden entwickelt, so begegnet man bald zahlreichen, in den Bau dieses Bakteriums tief eingreifenden Differenzen. Es ist wahrlich zu verwundern, dafs man den Veränderungen, welchen der Entwicklungszyklus des Bact. anthracis auf dem Glyzerinagar unterliegt, bislang nicht die geziemende Aufmerksamkeit geschenkt hat, da ja das Milzbrandbakterium mit zu den am meisten untersuchten Objekten gehört.

Vor allem soll jedoch in aller Kürze rekapituliert werden, was über den Entwicklungszyklus des Milzbrandbakteriums allgemein gelehrt wird.

Befindet sich dasselbe in ihm zusagenden Lebensbedingungen, so teilt sich dasselbe sehr lebhaft und bildet Fäden; nach einer Reihe von Generationen (im Durchschnitte 30—70 Generationen bei 37° auf Agar) kommt es infolge der Erschöpfung der im Nährboden enthaltenen Nährstoffe und besonders, wie A. Fischer anführt, infolge der Anhäufung von Stoffwechselprodukten, zur Sporenbildung, wenn gewisse dazu unerläfsliche Bedingungen erfüllt sind, so hauptsächlich eine bestimmte Temperatur und die Gegenwart freien Sauerstoffes. Nach der am meisten verbreiteten Ansicht keimen die Sporen auf dem Boden, in welchem sie entstanden sind, nicht mehr aus.[1]) Ein jeder Bazillus bildet nur eine Spore von eiförmiger Gestalt, deren Durchmesser denjenigen des Bakterienkörpers niemals übersteigt[2]), und welche stark lichtbrechend ist. Die Sporenbildung wird als ein teleologisches Moment angesehen, das der Arterhaltung dient.[3]) Der bei der Sporenbildung übrigbleibende Bakterienrest geht unter Zerfall zugrunde.

1) Günther, Einf. in d. Stud. d. Bakteriologie. 5. Aufl., 1898.

2) Kolle-Hetsch, Die exper. Bakteriol. etc. 1906, S. 22.

3) Kolle-Hetsch, a. a. O., S. 110.

Befindet sich das Bact. Anthracis in Bedingungen, welche dem Wachstum und Leben ungünstig sind, treten sog. Involutionsformen, Absterbeerscheinungen auf.[1]) Der Bazillus bläht sich dabei auf, vergröfsert sich, erleidet Mifsbildungen, verkrümmt sich in der verschiedenartigsten Weise, sein Protoplasma durchsetzt sich mit »Vakuolen«, er geht seiner Färbbarkeit und scharfen Begrenzung verlustig. Dann sind die Bazillen nicht mehr imstande sich zu vermehren, selbst wenn sie auf einen neuen Nährboden gebracht werden, sie sind abgestorben.

Kommt es zur geziemenden Zeit nicht zur Sporenbildung, so gehen die betreffenden Bakterien unter der Bildung von Involutionsformen[2]) zugrunde.

Dies in aller Bündigkeit die Quintessenz des heutigen Wissens vom Entwicklungszyklus des Milzbrandbakteriums.

Bei der Revision dieser Angaben taucht jedoch bald eine Reihe von Fragen auf, deren Beantwortung nicht ohne Einflufs auf die Ausgestaltung unserer Vorstellungen vom Entwicklungszyklus dieses Bakteriums bleiben kann.

Von diesen Fragen will ich nur die folgenden hervorheben, da sie in enger Beziehung zu den in dieser Arbeit mitgeteilten Eruierungen stehen.

So steht die Antwort auf folgende Fragen aus: Welches ist die Bedeutung der Sporenbildung? Dienen sie tatsächlich der Arterhaltung und sind sie also eine zweckmäfsige Einrichtung, auf welche Weise erhalten sich die asporogenen Stämme, die — wie bekannt — aus sporogenen Milzbrandstämmen künstlich gewonnen werden können?

Welches ist die Ursache der Sporenbildung? Hängt sie tatsächlich mit der Erschöpfung der Nährstoffe zusammen und können daher die Sporen auf dem Nährboden, auf dem sie entstanden sind, nicht wieder auskeimen?

Welche Bedeutung kommt den Involutionsformen zu? Sind sie tatsächlich Absterbeerscheinungen? In dem Buche von Kolle-

1) Günther, a. a. O., St. 16.

2) Lehmann-Neumann, Atl. u. Grundrifs d. Bakteriol., 1904, S. 38.

Hetsch[1]) kann man lesen: »Während — — bestimmte Bakterienarten unter ungünstigen Ernährungsverhältnissen allmählich absterben[2]), ist anderen in diesem Falle durch die Bildung von Dauerformen die Möglichkeit gegeben, sich lebensfähig zu erhalten.« Bei dem Bac. anthracis begegnen wir nun sowohl Involutionsformen wie Sporen. In welchen gegenseitigen Beziehungen stehen nun die beiden zu einander?

Im nachstehenden will ich nun die gestellten Fragen zu beantworten suchen.

Vor Allem schreite ich an die Schilderung der Art, in welcher sich das Milzbrandbakterium auf gewöhnlichem und Glyzerinagar entwickelt. Die Entwicklung habe ich parallel in der Weise verfolgt, dafs ich von der Mutterkultur gleichzeitig mit demselben Partikelchen beiderlei Nährböden beschickt und von den neuen Kulturen in der oben angegebenen Weise bearbeitete, in verschiedenen Zeitintervallen entnommene Proben untersucht habe.

Da die Entwicklung auf dem Glyzerinagar im Vordergrunde unseres Interesses steht, so wende ich mich vor allem der Schilderung derselben zu, um später auf die Differenzen einzugehen, welche sich mit Bezug auf die Entwicklung auf dem gewöhnlichen Agar ergeben.

Die Kulturen, deren Typus ich im nachfolgenden schildere, stammten von virulenten Stämmen und wurden bei 37° C gezüchtet, doch traten die geschilderten Phänomene auch in Kulturen, welche bei 17° gehalten wurden, freilich etwas später, auf.

In den ersten Stunden beherbergt eine Glyzerinagarkultur nur homogen, diffus gefärbte, zu Fäden aneinandergereihte Individuen von hohem Glanze und einer bemerkenswerten Prallheit des Inhaltes. Es kommt jedoch bald zu einer Differenzierung des Inhaltes derselben (etwa in der Art der Fig. 2A).

Zwischen der 3. und 5. Stunde der Kultivation beginnen in den Stäbchen zuerst unscharfe, dann scharf begrenzte, bei

1) Kolle-Hetsch, a. a. O., S. 22.

2) Unter Bildung von Involutionsformen, wie ich oben nach Lehmann-Neumann angeführt habe.

der verwendeten Präparationsmethode ungefärbte Flecken aufzutreten, welche Körnern einer stärker lichtbrechenden Substanz entsprechen. Die Zahl derselben kann variieren; in den Fäden trifft man in hintereinander folgenden Stäbchen die folgende Anordnung der erwähnten Körner. Nimmt man ein mit einem zentralen Korne versehenes Stäbchen als erstes hin, so enthält das zweite zwei, das dritte drei, das vierte vier kleinere oder zwei gröfsere, in gröfserem Abstande voneinander postierte, das fünfte schliefslich zwei noch gröfsere und noch weiter voneinander entfernte Körnchen, während man statt des sechsten Stäbchens zwei mit etwas abgeplatteten Polen aneinanderstofsende grofse, glänzende Körper findet, welche im Faden die Stelle von ganzen Bakterien einnehmen, oder zwei ähnliche, kugelige nebeneinanderliegende Körper. Es ist somit klar, dafs sich die oberwähnten Körnchen vermehren und event. bis zur Gröfse des Bakterienindividuums anwachsen. Diese Körner, welche insbesondere solange sie klein sind, eine grofse Ähnlichkeit mit sporogenen Körnern aufweisen, werde ich weiterhin als sporoide Körner bezeichnen, welche Bezeichnung in keiner Weise präjudiziert, welcher Art Gebilde sich aus jenen Körnern eigentlich entwickeln, sondern nur die äufserliche Ähnlichkeit der Körner mit den Sporen betonen, welche, wie ich später zeigen werde, in mancher Hinsicht ziemlich grofs ist.

Ich mufs konstatieren, dafs die Vermehrung und das Wachstum der sporoiden Körner nicht überall in der obenbeschriebenen eintönigen Weise vor sich geht, man kann in einem Bazillus einen grofsen zentralen Körper, zu beiden Seiten des letzteren aber noch je ein kleines Körnchen vorfinden, oder es können sich in einem Bazillus mehrere kleine Körner ansammeln, die zum gröfsten Teile eine Kolumne in der Mitte der Längsachse des Bakteriums bilden; dabei können sie sich entweder nur mit ihrer Peripherie berühren, so dafs sie ein aus 4—5 Kügelchen gebildetes rosenkranzförmiges Gebilde bilden, oder sie gruppieren sich so, als wenn sie eine längliche, enge Lakune in der Bazillensubstanz, welche von 3—6 vertikal auf die Längsachse gestellten, in regelmäfsigen Abständen postierten Scheidewänden durch-

zogen ist, bilden würden. Die sporoiden Körperchen müssen jedoch keineswegs die Lage in der Mittellängslinie des Bakteriums einnehmen, sondern sie können einzeln auch in der Randnähe beliebig gelagert sein. (Fig. 1 A, Fig. 4 c, f.)

Manchmal sieht man eine Reihe kleiner Bazillen, welche je einen gröfseren, kugeligen, zentral gelegenen sporoiden Körper enthalten. Wie sich später ergeben wird, darf man in einem solchen Falle die letzteren trotz ihrer auffallenden Ähnlichkeit mit den Sporen nicht mit diesen Gebilden verwechseln.

Ein anderes Mal findet man selbst einen gröfseren zentralen sporoiden Körper von einer Querscheidewand geteilt. Schliefslich können in einem Faden sich mehrere solcher Körper entweder knapp hintereinander oder in kleinen Intervallen, welche sehr oft nur einer Scheidewand entsprechen, gelagert finden, darauf kann ein Fadenstück nicht differenzierter färbbarer Substanz in der Länge eines gröfseren Bakteriums folgen, das von einem ebenso langen Fadenabteil abgewechselt werden kann, der jedoch aus sporoider Substanz besteht; der Faden ist hierbei nicht in Bakterien geteilt, er bildet ein Ganzes — einen Scheinfaden.

Nach 18 Stunden überwiegen im Präparate lange Fäden, welche in sehr kleine Bakterienindividuen geteilt erscheinen; dieselben enthalten kleine sporoide Körperchen. Offenbar ist die Teilung sehr rege. (Fig. 3.)

Eine 24 Stunden alte Kultur. Die sporoiden Körperchen liegen oft mitten im Bazillus, vielfach jedoch auch an den Enden desselben. In diesem Falle werden sie oft gröfser als der Durchmesser des Stäbchens. Das Bild macht dann den Eindruck, als wenn es sich um eine abnormal gebildete Spore handeln würde, wie solche z. B. von Lehmann beschrieben worden sind. Es treten jedoch auch Bilder in Sicht, welche diese Deutung nicht unterstützen. Stäbchen, welche mehrere sporoide Körper enthalten, müssen nicht gröfser und auch nicht voluminöser sein als ein Bazillus, der nur einen solchen beherbergt. Die Form des Bakteriums kann regelmäfsig zylindrisch bleiben, manchmal aber, wenn der sporoide Körper eine bestimmte Gröfse erreicht hat, kann sich die zylindrische in einer Clostridium-

form verwandeln und kann diese Veränderung entweder kaum kenntlich oder auch sehr auffallend sein, in welch letzterem Falle nicht blofs das Wachstum der sporoiden Kugel, sondern wahrscheinlich auch der gesteigerte Turgor an der Hervorwölbung des Bazillenkörpers schuld trägt. (Fig. 21 d.) Doch ist das eben beschriebene Verhalten keinesfalls die Regel; manchmal sind die sporoiden Kugeln grofs, der Bakterienleib folgt aber nicht ihrem Wachstum. (Fig. 4 b., e.)

In dieser Zeit wird auch das Bestreben nach eiliger Teilung offenbar. Der Faden, in welchem sich eine gröfsere Menge sporoider Körper angesammelt hat, sucht sich augenscheinlich auf Partikel zu zerteilen, welche nur je einen solchen Körper enthalten, woraus Gebilde resultieren, die sich als kaum in die Länge gezogene Sphäroide darstellen, es entstehen fast isodiametrische Gebilde, die Form langer bazillärer Individuen schwindet; dafs es sich überhaupt um einen Bazillus handelt, erkennt man dann gegebenenfalls oft nur daran, dafs die aus der hastigen Teilung hervorgegangenen »kokkenförmigen« Gebilde durch die Hülle zu einem Fadengebilde verbunden sind. (Nr. 24.) Somit sehen wir, dafs auch bei dem Milzbrandbakterium der Entwicklungspleomorphismus in weitgehender Weise zutage tritt, freilich in einem anderen Sinne als Zopf gelehrt hat. Es hat den Anschein, als wenn die »kokkenförmigen« Endprodukte im Sinne der Verkleinerung des Organismus die kleinsten Teile wären, welche noch alle Funktionen der lebenden Substanz auszuüben und alle Arteigenschaften des Bact. Anthracis zu erhalten vermag. (Fig. 3a, 24).

Kultur von 40 Stunden. Es ist klar, dafs sich die ausgebildeten sporoiden Kugeln vergröfsern, aber im grofsen und ganzen verbleiben sie in den durch den Dickendurchmesser des Bakteriums gegebenen Dimensionen, welche sie nur unbedeutend überschreiten; in den übrigen Bakterien nehmen die kleineren sporoiden Körner entschieden an Zahl zu. Manchmal sind die Bazillen von ihnen im wahren Sinne des Wortes überstopft. Entweder kommt es also zur Bildung neuer Körner oder es entstehen solche Bilder in der Weise, dafs die Bakterien durch

zahlreiche, vielfach auch schräg (nicht vertikal auf die Längsachse, wie die Regel erheischt) gerichtete Scheidewände die in ihrem Innern gebildete sporoide Substanz aufteilen. (Fig. 4, b, e.) Dieser Vorgang ähnelt äufserlich einer Vakuolisation. Wie ich jedoch gleich von vornherein bemerken möchte, handelt es sich dabei um keine Vakuolisation. Die Färbung der Bakterien kann schwanken. Sehr oft färbt sich jener Teil der Bakterie, welcher mehrere kleinere sporoide Körner enthält (Fig. 4 a), intensiver als derjenige Teil, welcher keine aufweist. Des öfteren stöfst man auf gröfsere sporoide Kugeln, welche von einer Querscheidewand durchzogen sind. (Fig. 4 d.) Bei näherem Zusehen begegnet man auch solchen Bildern der Kugeln, welche entweder auf ein Zusammenschmelzen oder eine beginnende Einschnürung derselben hinweisen.

Kultur von 43 Stunden. Das Anwachsen und die Vermehrung der sporoiden Kugeln ist sehr gut wahrzunehmen. Nunmehr überschreiten sie bereits den Stäbchendurchmesser, auch der sporoiden Bazillen — so will ich diejenigen sporoiden Körper nennen, welche sowohl die Gröfse eines einzelnen Individuums aufweisen, als auch deren Stelle im Faden einnehmen (Fig. 2 A, 12) — gibt es mehr. Fäden mit kleineren Körnern gibt es weniger. Öfter erscheinen ganze Bazillen von Körnern durchsetzt. In anderen Fällen zeigen die Körner eine regelmäfsige Verteilung — dann ist auch das Bestreben nicht zu verkennen, durch fortgesetzte Teilung einen Zustand zu erreichen, in welchem jedes Korn in einem abgesonderten Chromatinteile liegt. Trotz des Zuwachses an sporoiden Körpern überwiegt der färbbare Teil noch immer. Einzelne besonders grofse sporoide Körper sind durch Querscheidewände in regelmäfsige oder unregelmäfsige Abteile zerlegt; insbesondere pflegen die beiden Polenenden durch Scheidewände abgeteilt zu sein, so dafs dann zwei kleinere kegelförmige Polenkörper einem mittelständigen, gröfseren, von Tonnenform ansitzen. Manchmal erscheint der Bazillus durch Scheidewände in sporoide Körperchen von ovaler Form geteilt, deren Längsachse mit der Querachse des Bazillus zusammenfällt.

46 Stunden alte Kultur. Je länger, desto gröſser wird die Unregelmäſsigkeit in der Lagerung der sporoiden Körperchen, es kommt selbst zum Zusammenflieſsen derselben zu ganz unregelmäſsig konturierten Gebilden. Auſserdem sieht man Fäden, die voluminöser, aber blässer gefärbt und von unregelmäſsig angelegten Scheidewänden durchsetzt sind (vielleicht infolge des unregelmäſsigen Wachstums der einzelnen sporoiden Körper) (Fig. 4e, 9, 12), in welchen die sporoiden Körper bereits dem Chromatin den Rang ablaufen. Es handelt sich zumeist um Scheinfäden, da die Grenzen der einzelnen Individuen nicht unterschieden werden können. Einzelne Partien des erhaltenen Chromatins zeigen eine intensive Färbung. Allem Anscheine nach sind diese Fäden der Ausdruck einer gesteigerten Wucherung, wobei die Vermehrungsfähigkeit vermindert, wo nicht sistiert erscheint. Viele sporoide Kugeln gehen weit über den Bazillendurchmesser hinaus.

48 Stunden alte Kultur. Die sporoiden Kugeln erscheinen bedeutend vergröſsert. Die Bakterien färben sich im groſsen und ganzen schwächer und enthalten intensiver tingierte Körnchen (Fig. 11, 12), welche wohl denjenigen entsprechen, die ich in meinen früheren Arbeiten beschrieben habe. Die meisten Fäden zeigen ein vergröſsertes Volumen. Manche sind fast gänzlich des Chromatins entblöſst, sie sehen oft genau so aus wie nach der Einwirkung chromatinolytischer Stoffe. Sehr oft stöſst man auf Scheinfäden. Während die Mehrzahl der Bakterien nur schwach gefärbt ist, treten hie und da spindelförmige Anschwellungen des Bakterienkörpers in Erscheinung, welche sehr intensiv tingiert erscheinen.

65—70 Stunden alte Kultur. Das Erste, was in die Augen fällt, ist eine neuerliche Vergröſserung der sporoiden Kugeln. Das Chromatin zwischen denselben hat sich bedeutend vermindert; sehr oft begegnen wir einer Reihe von Kugeln, welche voneinander nur durch mehr oder minder starke Scheidewände getrennt erscheinen (Fig. 12, 13). Während früher die zwischen den Kugeln befindlichen Bakterienkörper homogen erschienen oder höchstens, bei schwächerer Färbung, einzelne,

stärker färbbare Körnchen aufwiesen, bemerkt man in diesem Präparate eine solche homogene Struktur nur in den ganz kurzen Abteilen. Wo der Bakterienkörper auf weitere Entfernungen hin (also höchstens auf den doppelten Durchmesser der sporoiden Kugeln von mittlerer Gröfse) erhalten ist, zeigt er hier eine Netzstruktur. In zahlreichen Bazillen erscheinen Kornstrukturen, andere sind durch Querscheidewände in sporoide Abteile geschieden, deren Dimensionen noch kleiner sind als diejenigen der »kokkenförmigen«, durch hastige Teilung entstandenen Chromatinbrocken (Fig. 5, 6, 7, 8). Die Fäden nehmen bizarre Formen an, welche in der Weise zustandekommen, dafs in Fäden von regelmäfsiger Dicke entweder vergröfserte sporoide Körper oder vergröfserte Chromatinteile eingereiht erscheinen (Fig. 8, 9, 14, 16a, b, 19c, d). Es handelt sich um hypertrophische Gebilde, welche — sofern es sich um Chromatinformationen handelt — regelmäfsig auch durch eine viel stärkere Färbung ausgezeichnet sind. Ich bilde eine Reihe solcher Hypertrophien ab; zu diesen Bildern bemerke ich, dafs ich solche Fälle gewählt habe, in welchen ganz klar war, dafs es sich um keine unlösbare Fädenschlingen oder um übereinandergelegte Bakterien handelt. Zu weilen kommt es nun auch zu Verschmelzungen nebeneinanderliegender Elemente, wodurch oft die phantastischsten, wunderlichsten Bildungen entstehen (Fig. 14, 16b, 19a, b, c, d e). Desgleichen entstehen nicht minder wunderbare Formationen durch Verschmelzen von sporoiden Körpern (Fig. 14a). Viele Fäden bestehen eigentlich nur aus lauter sporoiden Elementen (Fig. 14, 16c) von verschiedener Gröfse und Form, welche nur durch dünne Wände eines Chromatinkittes, die letzten Reste der Bakterienleiber, zusammengehalten werden. An den Enden der Fäden liegen oft besonders grofse sporoide Kugeln.

Eine 72 Stunden alte Kultur enthält gleichfalls neben vielen sporoiden Kugeln hypertrophische Chromatinelemente; bei manchen Fäden hat es den Anschein, als wenn an den Stellen, an welchen die Kugeln gröfser sind, auch mehr Chromatinsubstanz angehäuft wäre; ich schliefse dies sowohl aus der Breite der Bazillen, als auch aus der Gröfse der Intervalle,

welche sie einnimmt (bei kleineren Kugeln kleinere, bei gröfseren Kugeln gröfsere Intervalle) und aus der Intensität der Färbung. An vielen Stellen treten, wenn auch nicht gerade Scheinfäden, so doch entschieden viel längere und auch dickere Bazillen in Sicht. An einzelnen Stellen liegen sporoide Kugeln frei. Stellenweise verschmelzen sie zu unregelmäfsigen Paketen. Die Menge der Chromatin- und Sporoidsubstanz ist ungefähr gleichgrofs.

Präparate aus einer 78 Stunden alten Kultur geben das weitere Freiwerden der sporoiden Kugeln kund. Vor der definitiven Auflösung in isolierte Kugeln verlieren viele Fäden ihre Färbbarkeit, jedoch nicht alle, so dafs sehr viele freigewordene Kugeln von einer dünnen Chromatinsubstanzhülle umgeben erscheinen. Des weiteren sieht man hypertrophische Formen von verschiedener Gestalt (von verdickten Stäbchen an bis zu keulenförmigen Gebilden), die insgesamt auch hyperchromatisch sind, aufserdem noch verschiedenartig gewundene Fäden, welche — soferne sie aus Chromatin bestehen — gleichfalls eine intensive Färbung aufweisen. Schliefslich bemerkt man auch verschiedene bizarre, kokarden- oder rosettenförmige Gebilde, deren Chromatinanteil durchwegs hyperchromatisch ist, und die oft am Ende von Fäden liegen, welche fast gar kein Chromatin enthalten.

88 Stunden alte Kultur. Das Chromatin schwindet zusehends. Nur in der Nähe grofser sporoider Kugeln bleiben gröfsere Partien der färbbaren Substanz erhalten, oft am Fadenende, jedoch auch mitten in demselben. Diese gröfseren Partien haben das Aussehen von Hypertrophien. Schätzungsweise scheint die Substanz der sporoiden Elemente das Chromatin an Masse zu übertreffen. Grofse Haufen von Kugeln aus zerfallenden Fäden bedecken bedeutende Teile des Gesichtsfeldes. Der Zerfall kommt durch Auflösung der Chromatinreste zustande. (Fig. 18.)

Eine 97 Stunden alte Kultur beweist, dafs die oben beschriebenen Erscheinungen im weiteren Verlaufe an Umfang zunehmen; der Zerfall in sporoide Kugeln trifft immer mehr Fäden.

In einer 102 Stunden alten Kultur ist der Zerfall bereits allgemein. Auffallend ist, wie sich die bereits früher vereinzelt aufgetretenen hypertrophischen Chromatinformen vergröſsert und vermehrt haben. (Nr. 21.) Diese keulen-, schlegel- und spindelförmigen Gebilde sind gleichzeitig intensiv hyperchromatisch. (Fig. 21.) Auch einzelne normal gewachsene Fäden sind stark gefärbt, doch sind sie nicht allzu häufig, die gröſste Mehrzahl ist entweder schwach gefärbt oder entfärbt, das Chromatin ist hauptsächlich nur noch als dünne Hülle der sporoiden Kugeln vorhanden. Die intensiv gefärbten Fäden enthalten eine groſse Menge ganz kleiner sporoider Körner, zugleich pflegen sie etwas dicker zu sein.

106 Stunden alte Kultur. Im Präparat erblickt man Haufen sporoider Kugeln, deren Zwischenräume eine zumeist formlose Chromatinsubstanz füllt. Hie und da kann man in den Haufen die früheren Fäden an der Lagerung der Kugeln und an dem Umstande erkennen, daſs das Chromatin die Lage derselben markiert (Fig. 17, 20). Keulenförmige Gebilde sind nicht mehr vorhanden.

126 Stunden alte Kultur; das Chromatin der nebeneinander liegenden Fäden flieſst bei dem Zerfall in Kugeln oft zu einem einheitlichen Ganzen zusammen, das den Dimensionen der verschmolzenen Bazillen entspricht; im übrigen ist der Befund demjenigen von der 88. Stunde kongruent, nur daſs die Bazillen voluminöser, die Fäden verschiedenartig gewunden sind, während keulenförmige hypertrophische Formen fehlen.

In der 165. Stunde ist der Zerfall so fortgeschritten, daſs fast alles Chromatin sämmtlicher Fäden verschwunden ist. Zuweilen sieht man zwischen den abgefärbten Fäden durch starke Färbung auffallende hypertrophische Gebilde. (Fig. 23.)

Eine 8 Tage alte Kultur repräsentiert das Bild eines vollkommenen Zerfalles. Man sieht nur freie Kugeln oder nur aus sporoiden Kugeln zusammengesetzte Fäden, nur hie und da einen Chromatinrest. Das gleiche Bild in der ganzen Kultur.

Nur selten trifft man auf kleine, enge, zu Ketten angeordnete Bazillen von homogener Beschaffenheit, stark gefärbt, oder auch

größere, im sonstigen analoge Stäbchen. Diese neuen Bazillen besitzen nur $^1/_2$ oder $^1/_3$ der Dicke der ursprünglichen Bakterien, so daſs wohl niemand ahnen würde, daſs es sich um Milzbrandbakterien handelt, sondern eher auf eine Verunreinigung der Kultur schlieſsen möchte. Zahlreiche Untersuchungen (Plattenverfahren) und kontinuierliche Beobachtung der angelegten Kulturen haben mich jedoch davon überzeugt, daſs es sich um eine neue Generation des Milzbrandbazillus — sozusagen um eine diminuierte Generation — handelt. Diese verkleinerten Bakterien treten nicht in jeder Kultur auf. Oft schwinden sie nach einigen Tagen und zwar — wie ich feststellen konnte — durch Bildung von sporoiden Körpern, wobei sie gleichfalls hypertrophische, keulenähnliche Formen, freilich in verkleinertem Maſsstabe erkennen lassen. Dieselben können in derselben Kultur noch einmal zum Vorschein kommen. Eine meiner Kulturen zeigte die diminuierte Generation am 8. Tage zum ersten Male, am 11. enthielt sie keine mehr, am 13. fanden sie sich jedoch wieder ein, um dann wiederum zu verschwinden, bis sie am 34. Tage noch einmal, und zwar zum letzten Male, auftraten.

Dann enthielten die Kulturen nichts mehr als nur Haufen sporoider Kugeln; die zu Beginn noch vorhandenen Chromatinreste verschwinden schlieſslich völlig.

Die Entwicklung von Körpern, welche den von mir eben beschriebenen ähnlich waren, hat Preisz[1]) in den sog. sekundären Kolonien auf gewöhnlichem Agarnährboden beobachtet. Er hält sie für vergröſserte Bungesche säurefeste Körper.

Da es nicht bei jeder Kultur des Bact. anthracis zur Entwicklung sekundärer Kolonien kommt, wenn sie aber auftritt auch ein Zeichen starker Wucherung ist, so steht die Angabe Preisz' in keinem Widerspruche zu meinen Beobachtungen. Sie zeigt nur, daſs es unzulässig wäre, irgendwelche Erscheinungen schematisch beurteilen zu wollen.

1) Preisz, Zentralblatt f. Bakteriol., I, 35, Orig. 1904.

So ist mir z. B. auch gut bekannt, dafs einzelne Milzbrandbazillenstämme imstande sind, auf dem Glyzerinagar unter gleichzeitiger Bildung sporoider Kugeln auch Sporen auszubilden; auch diese Fälle können von dem in dieser Arbeit entwickelten Standpunkte aus begriffen werden, wie ich später zeigen werde. Nur soviel möchte ich gleich hier hervorheben, dafs die Sporen sich in einem solchen von mir beobachteten Falle aus Stäbchen entwickelt haben, welche ein ganz ähnliches Aussehen aufwiesen wie die auf gewöhnlichem Agar aufgewachsenen Bazillen; dagegen waren diejenigen Individuen, welche die sporoiden Kugeln gebildet haben, in konstanter Weise viel voluminöser. Aufserdem kamen die Sporen nur zu Beginn der Zeit, in welcher es zur Entwicklung der sporoiden Substanz kam, zur Beobachtung; später fand ich in der Kultur nichts als sporoide Körper.

Trotzdem kann man — wiewohl ich einen ähnlichen Fall bis jetzt nicht zu Gesichte bekam — auch den Fall theoretisch für möglich halten, dafs Sporen und sporoide Körper in einer Kultur gleichzeitig vorkommen.

Von demselben Standpunkte aus sind die Fälle zu beurteilen, in welchen es auch auf gewöhnlichem Agar zur gleichzeitigen Bildung von Sporen und sporoiden Körpern kommt. Dieser Fall trat bei demselben Stamme ein, der auf dem Glyzerinagar Sporen bildete. Ich schliefse daraus, dafs bei diesem Stamme ein individuell geregelter Chemismus gewaltet hat. Der Ursprung und die Art seiner Züchtung ist mir nicht bekannt; ich erhielt denselben durch die Freundlichkeit des Herrn Professors Bail aus dem Institute des Herrn Professor Hueppe; ich selbst habe ihn auf Glyzerinagar bei 37° kultiviert. In diesem Falle wiesen die Individuen auf dem gewöhnlichen Agar ein bedeutend gröfseres Volumen auf als sonst — und dieser Umstand bildet wohl den Schlüssel zur Erklärung der oben erwähnten Erscheinung. Um sekundäre Kolonien im Sinne von Preisz hat es sich vorderhand nicht gehandelt. Dieselben sind jedoch später aufgetreten, so dafs man die be-

schriebenen Formen mit diesem Umstande in Zusammenhang bringen kann.

Ein asporogener Stamm, der auf gewöhnlichem Agar bei 17° kultiviert worden ist, wies, was den Charakter des Wachstums auf den beiden Nährböden betrifft, ein mit den sporogenen Stämmen kongruentes Verhalten auf. Auch er wuchs auf gewöhnlichem Agar (bei 37°) in einer Weise, welche auf eine minder rege Assimilation hinwies, viel kräftiger auf dem Glyzerinagar.

Auf gewöhnlichem Agar sind die Stäbchen dünner, schlanker, bilden zeitlich (bereits um die 20. Stunde herum) gewundene, zu Knäueln verschlungene Formen, erst später treten in ihnen winzige sporoide Körnchen auf. Während die Stäbchen etwas dicker und besser färbbar werden, wachsen die Körnchennur sehr wenig. Darauf erscheinen hyperchromatische, stark hypertrophierte Individuen und gleichzeitig den sporoiden ähnliche Körper; weiterhin an einzelnen hypertrophischen, aber zugleich hyperchromatischen Individuen stark gefärbte ovale Partien — allem Anscheine nach wohl Sporenanlagen (Fig. 25), aber zur Ausbildung und Freiwerdung von Sporen kommt es nicht. Die Hypertrophien sind hier unregelmäfsiger, weniger diffus als bei normalen Stämmen. Auch die Färbbarkeit ist im allgemeinen ganz deutlich herabgesetzt. Es kann geschlossen werden, dafs nicht soviel Chromatin gebildet wird, um zur Entstehung von Sporen zu führen.

Das Ende der Kultur bildet das Überwiegen von gewundenen, knäuelförmigen, mehr oder minder hyperchromatischen Formen. Stellenweise zerfallen die Fäden in ovale, schwach gefärbte Gebilde von der Gröfse der Sporen.

Auf dem Glyzerinagar begegnet man schon zeitlich stark hyperchromatischen Individuen, welche mit kleinen sporoiden Körnern versehen sind, und deren stellenweise, bis zur Kubusform herabgesetzte Dimensionen auf eine rasche Vermehrung hinweisen. Die sporoiden Körperchen wachsen und vermehren sich intensiv: infolgedessen werden die kleinsten

kubusförmigen Individuen durch das Wachstum der sporoiden Substanz und die Erhöhung des Turgors zu kugeligen, mit einer Chromatinhülle versehenen Gebilden von Kokkengröfse reduziert. (Fig. 24.) Gleichzeitig erblickt man auffallende hypertrophische Formen, doch von geringen Dimensionen, welche sehr oft von sporoiden Körnern durchsetzt erscheinen. Am 4. Tage laufen die sporoiden Kugeln den Chromatinteilen bereits entschieden den Rang ab, dann werden sie frei. Um dieselbe Zeit treten auch gröfsere hypertrophische und hyperchromatische Formen sowie kürzere Scheinfäden auf. Auch die zum Kitt der sporoiden Kugeln gewordenen Reste der früheren Bakterienleiber pflegen hyperchromatisch zu sein.

Interessant und für die besprochenen Vorgänge sehr charakteristisch ist der Umstand, dafs ein anderer Milzbrandstamm, der schon Jahre hindurch keine Sporen mehr produziert hat und diese ganze Zeit auf gewöhnlichem Agar bei 17° gezüchtet worden ist, nach Überimpfung auf gewöhnlichen und Glyzerinagar, die bei 37° gehalten wurden, auf diesem in analoger Weise wuchs wie der vorhergehende, auf jenem aber wirkliche Sporen bildete.

Da diese Sporen nach kurzer Zeit (8 Tagen) aus der Kultur fast gänzlich verschwunden sind, so nehme ich an, dafs sie zu neuen Fäden angewachsen sind, welche dann gewundene, knäuelförmige und andere hypertrophische Formen ausgebildet haben. Darauf zerfielen viele Fäden in ovale, schwach gefärbte, mit Chromatinkörnchen versehene Körperchen, unter welchen auch hie und da ein kleines sporoides Korn frei geworden ist.

Der Lebenszyklus der asporogenen Stämme des Milzbrandbakteriums weist somit keine bemerkenswerten Abweichungen auf — bis auf den Umstand natürlich, dafs er auf dem gewöhnlichen Agar mit der Bildung der gewundenen hypertrophischen (Involutions-)Formen endigt.

Nicht die Fähigkeit der Sporensubstanzbildung geht den asporogenen Stämmen ab; die sporoide Substanz wird gebildet, und selbst nach jahrelangem Schlummern der Sporenbildungsfähigkeit kann es wiederum zur Sporenbildung kommen. In

meinem Falle genügte die Versetzung in eine höhere Temperatur (37°), um sie herbeizuführen. Bei den erblich asporogenen Stämmen geht allem Anscheine nach die Regulationsfähigkeit dieser Substanz dauernd zu grunde, daher kommt es niemals zur Ausbildung der Sporen. Die Ursache davon ist in der Hypochromasie zu suchen. Von diesem Standpunkte aus ist es interessant, dafs als sehr seltene Erscheinung in den Kulturen auf gewöhnlichem Agar vom 11. Tage ab einzelne hypertrophische, ganz besonders auffallend hyperchromatische Fäden auftreten, in welchen dann immer ziemlich grofse sporoide Körper konstatiert werden können.

Es wäre gewifs sehr wichtig, wenn die zum Verluste der Regulationsfähigkeit bei den asporogenen Stämmen führenden Momente bezüglich ihrer Wirkungsweise genauer studiert würden. Dieses Problem wird uns jedoch weiterhin nicht beschäftigen.

Vergleicht man nun die Entwicklung des Milzbrandbazillus auf dem Glyzerinagar mit derjenigen auf dem gewöhnlichen Agar, so bemerkt man, dafs die Differenzen in den folgenden Punkten liegen:

1. Die Individuen der Glyzerinagarkultur sind im Durchschnitte dicker als die Individuen der gewöhnlichen Agarkultur.
2. Zur Zeit, da auf dem gewöhnlichen Agar eine Menge von Sporen ausgebildet und frei wird, kommt es auf dem Glyzerinagar zur reichlichen Bildung von sporoiden Kugeln, während Sporen für gewöhnlich nicht nachgebildet werden.
3. Die Bildung der Sporen sowohl wie die Bildung der sporoiden Kugeln ist von dem Auftreten verbogener, hypertrophischer und zugleich auch hyperchromatischer Formen begleitet; auf gewöhnlichem Agar geht dieser Vorgang jedoch nicht weiter, während auf dem Glyzerinagar auch diese Formen sporoide Körper hervorbringen und schliefslich zerfallen. Infolge dessen findet man

4. in alten Kulturen auf gewöhnlichem Agar verbogene, knäuelförmig verschlungene, gewöhnlich die Normalmafse nicht überschreitende, nur stellenweise stark hypertrophische, weiterhin eventuell neue, aber von dünnen und kleinen Individuen gebildete Fäden und freie Sporen; in alten Kulturen auf Glyzerinagar dagegen nichts als Haufen freier sporoider Kugeln, die höchstens in zerfallenem, diffus sich färbendem Chromatin liegen.

Als erste Frage bietet sich, ob die sporoiden Kugeln den Sporen homologe Gebilde sind, ob sie die Sporen zu vertreten, wie die Sporen die Kontinuität der Art zu erhalten vermögen?

Um dies zu eruieren, unternahm ich eine Reihe von Versuchen. Da es unmöglich ist, die ganze Kultur mikroskopisch zu untersuchen, um festzustellen, ob etwa in den Massen sporoider Kugeln nicht irgendwo noch ein vermehrungsfähiger Bazillus läge, so habe ich die Kontrolle des überimpften Materials in der nachstehenden Weise ausgeführt.

Von der Mutterkultur, welche nach der mikroskopischen Untersuchung blofs sporoide Kugeln enthielt, verimpfte ich ein Teilchen auf neue Nährböden. Das verimpfte, sehr kleine Teilchen wurde mit Hilfe des Kondensationswassers auf der Oberfläche des neuen Nährbodens verrieben, der Ausstrich gemischt und nach gründlicher Vermischung von demselben ein Teilchen zur Anfertigung des mikroskopischen Präparates benutzt.

Durch solches Vorgehen glaube ich die Möglichkeit eines Irrtumes bezüglich der Gegenwart oder Abwesenheit von vermehrungsfähigen Bakterien in dem auf den neuen Boden übertragenen Teilchen auf das geringste Mafs beschränkt zu haben.

Es folgen einige meiner Versuche:

**Nr. 12.** 22 Tage, bei 37° gehaltene alte Glyzerinagarkultur besteht aus blofsen sporoiden Kugeln, wird auf gewöhnlichen und auf Glyzerinagar verimpft und bei 37° weiter gezüchtet. Nach Ablauf von 19 Stunden war makroskopisch noch nichts vom Wachstum wahrzunehmen. Aber nach 43 Stunden ging alles an. Mikroskopisch war freilich schon in dem 19 Stundenpräparate Wachstum zu konstatieren. Dasselbe verlief in der für beide Nährböden typischen Weise.

**Nr. 14.** Andere, gleich alte und in gleicher Weise gezüchtete Kultur, enthaltend nur sporoide Kugeln, wurde auf gewöhnlichen und Glyzerinagar verimpft und bei 37° gehalten. Im mikroskopischen Präparat bereits nach 19 Stunden Wachstum. Nach 43 Stunden beiderseits reichliches Wachstum.

**Nr. 15.** Eine 25 Tage alte, auf Glyzerinagar bei 37° gehaltene, nur aus freien sporoiden Kugeln bestehende Kultur wurde auf gewöhnlichen und Glyzerinagar verimpft und bei 37° weiterkultiviert. Auf dem gewöhnlichen Agar ging die Saat in 24 Stunden ausgezeichnet an; das mikroskopische Bild war für das Wachstum auf gewöhnlichem Agar typisch. Aber auf dem Glyzerinagar kam es zu keiner Entwicklung. Das mikroskopische, in der 24. Stunde entnommene Präparat enthielt sporoide Kugeln und halbentfärbte Bakterienreste, daneben aber auch gekrümmte hyperchromatische Formen, Fadenknäuel und auch gerade Fädchen von gut färbbaren, kurzen Bazillen, welche sporoide Körner enthielten, die zwar absolut genommen klein, aber im Verhältnis zu denjenigen, welche um dieselbe Zeit auf gewöhnlichem Agar aufgetreten sind, viel gröfser waren. Ich glaube schliefsen zu dürfen, dafs in dieser Kultur das überimpfte Material zu wachsen anfing, dafs aber das Wachstum wohl durch Zerfall in sporoide Kugeln aufgehört hat, da sich die Kultur nicht mehr vergröfsert hat.

**Nr. 16.** Eine 25 Tage alte, bei 37° kultivierte Glyzerinagarkultur wurde auf die beiden Nährböden verimpft, welche bei 37° im Thermostat blieben. Dieselbe enthielt massenhafte sporoide Kugeln mit Resten von Bakterienkörpern. Die Saat ging auf dem gewöhnlichen Agar binnen 24 Stunden sehr gut an. In der Glyzerinagarkultur kann man wiederum Spuren anhebender Vermehrung konstatieren (aus kurzen, mit sporoiden Körnchen versehenen Fädchenbazillen bestehende Fädchen), welche manchmal direkt mit Häufchen von sporoiden Kugeln zusammenhängen (Fig. 26)), doch hat sich die Wucherung nicht erheblich ausgebreitet und sistierte schliefslich.

**Nr. 20.** Eine 30 Tage alte, bei 37° auf Glyzerinagar gehaltene, freie sporoide Kugeln, Chromatindetritus und Bakterienreste enthaltende Kultur wurde in der üblichen Weise verimpft und die neuangelegten Kulturen bei 37° weitergezüchtet. In den beiden Kulturen trat ein für die betreffenden Nährböden völlig typisches Wachstum ein.

**Nr. 23.** Eine 24 Tage bei 17° auf Glyzerinagar gezüchtete Kultur, bestehend aus sporoiden Kugeln und Chromatinresten, wurde in der gewohnten Weise verarbeitet; eine Hälfte der neuangelegten Kulturen wurde bei 17°, die andere bei 37° gehalten. Keine von diesen Kulturen ist aufgewachsen.

**Nr. 24.** Eine 38 Tage bei 17° gehaltene Glyzerinagarkultur, die nur aus freien sporoiden Kugeln bestand, wurde einem starken Meerschweinchen verimpft. Das Tier ging am 4. Tage zugrunde. Aus dessen Blut wurde ein völlig typisches Milzbrandbakterium gezüchtet, das auf gewöhnlichem Agar üppig wuchs.

**Nr. 25.** Eine 34 Tage alte, bei 17° gewachsene Glyzerinagarkultur, welche Haufen von sporoiden Kugeln enthielt, wurde auf gewöhnlichen und Glyzerinagar verimpft, die im Thermostat bei 37° Platz fanden. Während

die Kultur auf gewöhnlichem Agar im Laufe von 44 Stunden in typischer Weise reichliches Wachstum zeigte, blieb die Glyzerinagarkultur steril.

**Nr. 26.** Eine 32tägige Glyzerinkultur von 37°, die nur aus sporoiden Körpern bestand, wurde wie im vorigen Versuche verimpft, die neuangelegten Kulturen bei 37° gehalten. Beide blieben steril.

**Nr. 29.** Eine 35 Tage auf Glyzerin bei 37° gezüchtete Kultur, nur aus sporoiden Kugeln bestehend, wurde wie Nr. 26 behandelt. Keine von den neuen Saaten ist angegangen.

**Nr. 32.** Eine 53 Tage bei 17° gehaltene Glyzerinagarkultur, die im mikroskopischen Präparate keine Spur von Bakterien oder deren Resten erkennen liefs und nur aus sporoiden Kugeln zusammengesetzt schien, welche höchstens einen dünnen Chromatinsaum aufwiesen, habe ich auf gewöhnlichen und Glyzerinagar übertragen und bei 37° weiterkultiviert. Am dritten Tage zeigte sich auf dem Glyzerinagar noch kein Wachstum. Dasselbe blieb auch fernerhin aus, auf dem gewöhnlichen stellte sich dagegen überaus üppige Wucherung ein.

Wenn man nun nach der Bedeutung der angeführten Versuchsresultate fragt, so dürfte beim ersten Eindruck das Schwanken der Ergebnisse in die Augen fallen.

Während die jüngeren Stadien mehr positive Ergebnisse liefern, weisen die älteren mehr negative Resultate auf.

Man darf jedoch nicht übersehen, dafs man mitten in den positiven Resultaten von den jüngeren Stadien auch ein negatives (Vers. Nr. 23) antrifft, und dafs umgekehrt zwischen den negativen Ergebnissen von den älteren Stadien auch ein positives (Vers. Nr. 20) sich vorfindet.

In letzterer Beziehung ist namentlich das Ergebnis des Vers. Nr. 24, in dem eine Kultur, in welcher bei der mikroskopischen Untersuchung nichts als sporoide Kugeln festgestellt werden konnten, den Tod des Versuchstieres im Laufe des vierten Tages nach der Infektion herbeigeführt hat und aus dem Blute des letzteren ein typisches Milzbrandbakterium herangezogen wurde.

Wiewohl in den zitierten Versuchen bei der von mir verwendeten Methode der Untersuchung des auf die frischen Böden übertragenen Materials die Wahrscheinlichkeit, dafs nur sporoide Kugeln zur Überimpfung gelangt sind, so grofs, als überhaupt zu erzielen war, so kann doch die Eventualität nicht ausgeschlossen werden, dafs sich zwischen denselben vielleicht ein

noch vermehrungsfähiger Bazillus befand, auf dessen Rechnung das erzielte Wachstum gesetzt werden könnte. Nichtsdestoweniger mufs ich diese Annahme als sehr wenig wahrscheinlich bezeichnen. Doch habe ich in Präparaten aus den neuangelegten Kulturen, welche gut angegangen sind, selbst in den zeitlichsten Stadien und beim genauesten Studium niemals solche Bilder finden können, welche den Schlufs, dafs das Wachstum dieser Kulturen von den sporoiden Kugeln selbst ausgegangen ist, wie es in gewöhnlichen Agarkulturen von den Sporen ausgeht, zur Notwendigkeit gemacht hätten.

Ich habe daher mikroskopische Kulturen von gewöhnlichem und von Glyzerinagar angelegt, die ich mit nur sporoide Kugeln enthaltenden Kulturteilchen infiziert habe. Bestimmte Gruppen der Kugeln werden mit Hilfe des Kreuztisches fixiert und mehrere Tage kontinuierlich beobachtet. Wiewohl es in allen diesen Kulturen zur Entwicklung neuer Fäden kam, konnte ich in keinem einzigen Falle konstatieren, dafs sie von jenen Kugeln ausgegangen wäre. Die sporoiden Kugeln blieben unverändert, selbst wenn die Kultur üppig anging.

Da dieses Resultat durch direkte Beobachtung gewonnen wurde, während der Ursprung der positiven Resultate bei der Übertragung von aus sporoiden Kugeln bestehenden Kulturen auf neue Böden direkt nicht festgestellt werden kann, so mufs ich dem ersteren bei der Bewertung der Bedeutung der sporoiden Kugeln ein gröfseres Gewicht beimessen. Ich neige daher zu der Ansicht hin, dafs die sporoiden Kugeln zur Zeit, als sie eigentlich allein die ganze Kultur zusammensetzen, nicht mehr lebendig sind.

Wenn sich zwischen den sporoiden Kugeln vielleicht irgendwelche Sporen verborgen hätten, die meiner Beobachtung etwa entgangen wären, so wäre es unmöglich, die negativen Resultate auf dem Glyzerinagar bei dem gleichzeitigen positiven Resultat auf dem gewöhnlichen Agar zu erklären, denn die Sporen kommen auf dem Glyzerinagar ebensogut zur Keimung.

In Ansehung dieser Umstände bleibt die Frage, wie das Wachstum der Kulturen aus den überimpften sporoiden Kugeln

möglich ist, auch fernerhin offen. Dieselbe besitzt zwar für das Thema der vorliegenden Arbeit keine direkte Bedeutung. Nichtsdestoweniger möchte ich aufmerksam machen, dafs mit den sporoiden Kugeln stets eine mehr oder minder grofse Menge von Chromatindetritus übertragen wird.

Die Frage der Bakterienmerotomie wurde bis jetzt noch überhaupt nicht in Angriff genommen; wir wissen somit nicht, wie kleine Bruchstücke des Bakterienkörpers noch einer Regeneration zu ganzen Individuen fähig sind, ja wir wissen sogar noch nicht einmal, ob die merotomierten Bakterien überhaupt regenerationsfähig sind. Mit den darauf bezüglichen Versuchen habe ich jedoch bereits begonnen und werde nicht ermangeln, in nächstmöglicher Zeit über dieselben zu berichten.

An dieser Stelle möchte ich jedoch hervorheben, dafs in jenen Fällen, in welchen meine Versuche ein Wachstum auf den beiden zur Verwendung gelangten Nährböden ergeben haben (also in den Vers. Nr. 12, 14, 20), in dem Impfmaterial verhältnismäfsig viel gut färbbare, geformte Chromatinreste mit enthalten waren; in den Versuchen mit negativem Resultat auf den beiden Nährböden (Vers. Nr. 23, 26, 29) fehlten entweder solche Reste, oder sie waren schlecht färbbar. Schlechte Färbbarkeit von sonst gut färbbaren Objekten gilt jedoch allgemein als ein Zeichen herabgesetzter oder erloschener Vitalität.

Mit diesem Hinweis stimmt die Tatsache überein, dafs die älteren Stadien der Sporoidkörper, wie ich oben erwähnt habe, bei der Übertragung mehr negative Resultate liefern; ich habe ja bereits früher angegeben, dafs die Entwicklung der Sporoidkugeln mit fortschreitendem Chromatinverlust verbunden ist.

Dafs die in den oben besprochenen Versuchen zutage tretenden Differenzen der Resultate überhaupt von dem Umstande, ob die verimpften sporoiden Kugeln lebendig oder tot sind, nicht abhängen, zeigen übrigens die Vers. Nr. 15, 16, 25, 32, in welchen die aus der Mutterkultur überimpften Teilchen nur auf einem der ihnen unten sonst völlig gleichen Bedingungen gebotenen Nährböden und zwar übereinstimmend nur auf dem gewöhnlichen Agar aufgewachsen sind. Die auf

das Glyzerinagar übertragenen Teilchen sind in diesen Versuchen niemals angegangen.

Mit Hinblick auf den von mir gleich zu Beginn dieser Abhandlung hervorgehobenen Umstand, dafs nämlich das Milzbrandbakterium auf dem Glyzerinagar kräftiger wächst als auf dem gewöhnlichen, könnte das Resultat der eben zitierten Versuche paradox erscheinen.

Es wird von weiteren Versuchen abhängen, ob die in den eruierten Tatsachen zutagetretende Differenz wird ausgeglichen werden können.

## IV. Die sporoiden Körper.

Ich glaube, aus meinen Beobachtungen über die sporoiden Körper schliefsen zu dürfen, dafs diese Körper, nachdem sie sich aus den durch sporoide Metamorphose der Fäden gebildeten Verbänden losgelöst haben, nicht mehr lebendig sind.

Da nach Ablauf einiger Zeit die ganze Glyzerinagarkultur aus derartigen toten sporoiden Körpern besteht, schien es mir wichtig, zu erfahren, ob die Substanz derselben nicht irgendwie chemisch charakterisiert werden könnte.

Ich hege die Überzeugung, dafs eine in bestimmter Richtung geführte chemische Analyse der nur aus sporoiden Kugeln bestehenden Kultur im Vergleiche zu derjenigen einer jungen, auf gewöhnlichem Agar aufgewachsenen, für die allgemeine Biologie sehr interessante Resultate zeitigen müfste. Der Verlauf meiner Beobachtungen liefs mir jedoch vorläufig die mikrochemische Untersuchung der sporoiden Körper als zweckmäfsiger erscheinen.

Sowohl die kleinen, als auch die grofsen sporoiden Körper erscheinen als farblose, Lichtstrahlen stark brechende, daher hoch glänzende Gebilde. Ich habe keinen Unterschied zwischen dem Glanze derselben und demjenigen der Sporen des Milzbrandbazillus konstatieren können.

Bezüglich des Verhaltens den Farbstoffen gegenüber hebe ich hervor, dafs sich die sporoiden Körper substantiv weder mit

den basischen, noch mit den saueren Farbstoffen tingieren, weder vital, noch nach physikalischer Fixation kann eine solche Färbung erzielt werden. Auch mit Hilfe der Sporenfärbungsverfahren gelingt es nicht, diese Körper zur Färbung zu bringen.

Ein, jedoch kleiner Teil der sporoiden Körper färbt sich metachromatisch bei Benutzung des Karbolmethylenblaues nach der Angabe von Krompecher. Da die Färbung nur auf einen kleinen Teil der Körper — hauptsächlich auf die in den Stäbchen eingeschlossenen Körner und Kugeln — beschränkt ist, bei den freien sporoiden Kugeln aber zumeist negativ ausfällt, so mufs geschlossen werden, dafs die Substanz der Mehrzahl der sporoiden Körper mit der säurefesten Substanz der Krompecher'schen Gebilde nicht identisch ist. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dafs die letztere ein jüngeres Entwicklungsstadium der sporoiden Körper darstellt.

Wie ich bereits erwähnt habe, hat wohl auch Preisz[1]) schon die Entwicklung der sporoiden Körper beobachtet. Nach seiner Angabe treten bei träger Sporenbildung und noch mehr in sekundären Kolonien kugelige, schollenförmige oder zylindrische Gebilde auf, welche die Spore an Gröfse weit übertreffen und manchmal den ganzen Körper des Bazillus ausfüllen. Oft findet man, nach diesem Autor, lange und dicke (sekundäre) Bazillen, deren Mittelteil nur von einem länglichen, säurefesten Körper gebildet ist, auch in den langen geschlängelten Sekundärbazillen können manchmal ziemlich lange, säurefeste Abteile beobachtet werden, schliefslich kann diese Substanz auch frei zwischen den Bazillen in Form von Kugeln, Ovalen, Tropfen, Biskuits oder stumpf verzweigten Formen liegen, welche die Spore oft an Gröfse überragen.

Preisz hält diese Gebilde für die gewucherte Substanz der Bungeschen säurefesten Körper. Es ist jedoch klar, dafs hiermit jene Substanz keineswegs genügend charakterisiert erscheint. Aufserdem gibt jedoch Preisz an, dafs die besprochene Substanz dieser Eigenschaft selbst gänzlich verlustig werden kann. Preisz gibt zwar nicht an, aus welchen Beobachtungen er diesen Schlufs abgeleitet hat. Da er aber die Säurefestigkeit mit Hilfe

der Färbung durch Karbolfuchsin und nachträglicher Übertragung in 5proz. Schwefelsäure festgestellt hat, so glaube ich, dafs er die obige Schlufsfolgerung auf den negativen Ausfall dieser Färbung begründet hat. Tatsächlich kann man wahrnehmen, dafs sich ein bedeutender Teil der sporoiden Körper bei Anwendung jener Methode nicht färbt. Kann man jedoch hieraus einen Schlufs auf ihre Säurefestigkeit ziehen? Wohl kaum, denn ich fand in meinen Präparaten die Körper auch dann noch vor, wenn sie sich bei Anwendung der obigen Färbungsmethode nicht tingiert haben. Die Säurefestigkeit derselben wird am besten dadurch bewiesen, dafs sie sich im Magensafte nicht auflösen und auch in Salzsäure 4 : 3 Wasser erhalten bleiben.

Es ist mir gelungen, folgende Methoden erfindlich zu machen, mit deren Hilfe man eine Färbung der sporoiden Kugeln bewirken kann, während die Sporen sich nie färben, so dafs diese Methoden als differentiell-diagnostisches Hilfsmittel in Betracht kommen.

I. Man mischt gleiche Teile einer konzentrierten wässerigen Sublimatlösung und einer mit Wasser verdünnten alkoholischen Fuchsinlösung. Der hierbei entstehende starke Niederschlag behindert die Färbung nicht im mindesten, da er beim Ausspülen mit Wasser weggeschwemmt wird; man darf jedoch kein lange stehengebliebenes Gemisch benutzen. Mit diesem Gemisch fixiert und färbt man das lufttrocken gemachte Präparat gleichzeitig. Als Resultat ergibt sich die Rotfärbung eines grofsen Teiles der sporoiden Körper. Die Färbung ist diffus, im Zentrum am stärksten und läfst bei einer Anzahl der Körper eine dünne, ungefärbte peripherische, unter dem umhüllenden Chromatinsaum liegende Zone erkennen. Ein Teil der Körper bleibt auch bei diesem Verfahren ungefärbt.

II. Das lufttrockene Präparat wird mit konzentrierter wässeriger Sublimatlösung fixiert, mit verdünntem Fuchsin gefärbt, darauf der Einwirkung der Lugolschen Lösung ausgesetzt; es folgt Abspülung mit Wasser, Abtrocknen, Einschlufs in Kanadabalsam. Bei Benutzung dieses Verfahrens färbt sich die Mehrzahl der sporoiden Kugeln und ist die Färbung der einzelnen

Körper zwar gleichmäfsig, aber im Tone verschieden. Man sieht nämlich die Körper 1. ungefärbt, 2. rein blau gefärbt, 3. bläulich, 4. dunkelviolett tingiert. Es ist gewifs erlaubt, dieses Färbungsresultat als den Ausdruck verschiedener chemischer Zustände aufzufassen, die vielleicht mit Entwicklungsstadien der sporoiden Körper zusammenhängen. Nur ein kleiner Teil (zumeist der freien) Kugeln bleibt bei dieser Methode ungefärbt.

III. Den Wert eines direkten Reagens auf die sporoiden Kugeln besitzt jedoch die Lugolsche Lösung allein angewendet. Mischt man die Kultur direkt in dieselbe hinein, so färben sich sämtliche sporoide Körper des Präparates in gelbem bis braunem Tone.

IV. Nicht minder präzis ist die Färbung mit Naphtholblau nach der Vorschrift von Dietrich und Liebermeister; kurz nach der Vermischung des Dimethylparaphenylendiamins und $\alpha$-Naphthols mit dem das Kulturteilchen enthaltenden hängenden Tropfen stellt sich die sattblaue Färbung der sporoiden Körper ein.

Was die eigentlichen chemischen Reaktionen betrifft, so gibt das Millonsche Reagens eine makroskopische Rotfärbung des aus sporoiden Kugeln zusammengesetzten Kulturteilchens; mit dem Mikroskope kann man nur feststellen, dafs diese Färbung diffus ist und von einer schwachgelben Färbung der einzelnen Elemente herrührt. Der Bakterien gibt es im Präparate so wenig, dafs die zitierte Reaktion einzig auf die sporoiden Körper bezogen werden kann. Daraus ginge hervor, dafs dieselben aus Eiweifsstoffen bestehen.

Dieses Resultat ist insofern von Bedeutung, als die positive Jod-Jodkaliumfärbung an die Deutung denken lassen könnte, dafs es sich um Glykogen handelt. Dafs dies jedoch nicht der Fall ist, zeigt schon die Unlöslichkeit der Körper im Wasser, die sich selbst dann offenbart, wenn die vollkommen freien Kugeln nicht die geringste Spur einer Chromatinhülle zeigen und von dem umgebenden Medium nur durch ihr stärkeres Lichtbrechungsvermögen abstechen. Denn das Glykogen ist wasserlöslich.

Im Alkohol sind die sporoiden Kugeln unlöslich; desgleichen in einem Gemisch von gleichen Teilen Alkohol und Äther, wodurch die durch das Aussehen, besonders den Glanz der Körper gestützte Annahme, dafs sie aus Fett oder einer fettartigen Reservesubstanz bestehen, gegenstandslos wird.

Wichtig ist, dafs die sporoiden Kugeln der künstlichen Magensaftverdauung nicht unterliegen. Da sie, wie der Ausgang der Reaktion mit Alkohol und Äther zeigt, nicht aus Fett gebildet sind, die Zusammensetzung derselben aus Keratin aber ausgeschlossen ist, so bleibt nur der eine Schlufs übrig, dafs sie nämlich aus Kernsubstanz bestehen.

Ich suchte, soweit dies angängig, auch noch und zwar auf Grund der von Frank-Schwarz angegebenen Reaktionen zu bestimmen, um welche Kernsubstanz es sich handle.

Und da habe ich festgestellt, dafs die sporoiden Kugeln von konzentrierten Lösungen von Kupfersulfat, Magnesiumsulfat und Ferrozyankalium (in welchen sie höchstens schrumpfen), ferner von 20proz. NaCl-Lösung und Salzsäure 4 : 3 Wasser unberührt bleiben.

Ich halte es für wichtig, hervorzuheben, dafs diese Reaktionen der sporoiden Körper mit denjenigen der Sporen zusammenfallen.

Auf Grund der angeführten Ergebnisse ist der Schlufs zulässig, dafs die sporoiden Kugeln ein Entwicklungsprodukt des Bact, Anthracis darstellen, das im wesentlichen die mikrochemischen Reaktionen der Sporen gibt. Abweichungen ergeben sich blofs in den Ergebnissen der Färbung nach den von mir angegebenen Verfahren I und II, weiterhin in der Reaktion mit Lugolscher Lösung.

## V. Die Bedeutung der Sporoidkörperbildung.

Zieht man in Erwägung, dafs bis zu einem gewissen Entwicklungspunkte die Bildung der Sporen und der Sporoidkörper parallel und völlig analog vor sich geht, dafs sie erst später divergiert, dafs beide Gebilde auf demselben chemischen Sub-

strate — dem vegetativen Milzbrandstäbchen — entstehen, dafs die chemische Zusammensetzung der beiden Produkte im wesentlichen analog ist, dafs schliefslich der morphologische Unterschied zwischen den beiden darauf beruht, dafs die Entwicklung der Sporoidenkörper durch ein progressives Wachstum und Vermehrung der eben charakterisierten Substanz zustande kommt, so wird man wohl keinen Fehlgriff tun, wenn wir die Bildung der sporoiden Körper als abnormale Entwicklung jener Substanz bezeichnen, welche — wenn das Milzbrandbakterium sich in anderen Lebensbedingungen befindet, auch die Sporen bildet. Gewisse Differenzen, welche sich bezüglich des mikrochemischen Verhaltens zwischen den fertigen Sporen und fertigen sporoiden Körpern aus meinen Untersuchungen ergaben, sind augenscheinlich auf die Rechnung der erwähnten Weiterentwicklung jener Substanz zu setzen.

Erinnern wir uns nunmehr, dafs die Entwicklung der sporoiden Körper auf dem Glyzerinagar vor sich geht. In derselben Zeit, da in der gewöhnlichen Agarkultur die Sporen sich freizumachen beginnen, heben die Milzbrandbazillenfäden auf dem Glyzerinagar an, zu Haufen sporoider Körper zu zerfallen. Es ist klar, dafs auf dem Glyzerinagar ein abnormal starkes Wachstum jener Substanz vor sich geht, die auf dem gewöhnlichen Agar die Dietrich-Liebermeisterschen Körnchen und die Sporen bildet, also dafs in abnormaler Weise eine Substanz gebildet wird, welche auch unter normalen Verhältnissen in dem Milzbrandstäbchen zur Bildung gelangt. Da wir wissen, dafs es dem Milzbrandbakterium auf dem Glyzerinagar besser ergeht, dafs auf demselben seine Assimilationstätigkeit erhöht ist, so vermögen wir zu begreifen, dafs es zum abnormalen Wachstum der Sporoidsubstanz kommt.

Die Bildung der Sporoidkörper fällt somit unter jene Vorgänge, welche ich als morphochemisch bezeichnet habe; die Sporoidsubstanz stellt sich, ähnlich wie die Spore, als eine Transformation des ursprünglichen Nukleinprotoplasmas des Milzbrandbakteriums dar.

Diese Transformation kommt — ein gewiß interessanter Fall des morphologischen Metabolismus des Protoplasmas — durch erhöhten Stoffwechsel, gesteigerte Assimilation zustande.

Kann dieser Ausspruch durch Beobachtungen gestützt werden?

Diesbezüglich genügt es, einen Blick auf die Entwicklung des Milzbrandbakteriums auf den Glyzerinagar zu werfen.

Da beobachtet man vor allem eine sehr rege Teilung, die einen nicht minder regen Stoffwechsel zur Voraussetzung hat; weiterhin beobachtet man die Ausbildung von Scheinfäden und voluminösere, dickere und längere Individuen überhaupt, Erscheinungen, welche nicht anders als durch erhöhtes Wachstum erklärt werden können, das nur auf Grund einer besseren Ernährung möglich ist. Schliefslich beobachtet man das auffallende Auftreten von hypertrophischen Formen, welche geradezu gigantische Verhältnisse zu erreichen vermögen; auch diese hypertrophischen Formen können nur durch erhöhte Assimilation erklärt werden.

In der oben mitgeteilten Auffassung bestärkt mich weiterhin auch der Umstand, dafs — wie man durch aufmerksames Studium der Präparate feststellen kann — die hypertrophischen Formen zu Beginn ihres Auftretens entweder homogen sind oder nur wenige kleinere sporoide Körper enthalten, später aber sich vergröfsern und je länger desto mehr mit sporoiden Körpern anfüllen, so dafs sie schliefslich vollgestopft von ihnen sind und zugrunde gehen, indem sie sich in freiwerdende Kugeln zerlegen. (Fig. 21 *l, f, o, h, i, k, p, a, m, n, j, c, x.*)

Eine weitere Stütze der Ansicht, dafs es sich um einen Ausdruck erhöhter Assimilation handelt, bildet der Umstand, dafs die hypertrophischen Formen wenigstens zu Beginn ihres Auftretens, zumeist jedoch noch viel länger, sich gleichzeitig auch auffallend hyperchromatisch zeigen. Diese Hyperchromasie führt mitunter bis zur Undurchsichtigkeit jener Elemente und kann nur darauf beruhen, dafs dieselben auf derselben Fläche mehr färbbare Substanz enthalten (wie sich aus einem Vergleiche mit normal färbbaren hypertrophischen Formen ergibt); was wiederum nur

die Folge einer vergröfserten Produktion jener Substanz auf Grund eines erhöhten Stoffwechsels sein kann.

Der Schlufs der Entwicklung auf dem Glyzerinagar ist in der Regel die Umwandlung sämtlicher Fäden in sporoide Kugeln.

Während sich die Bildung der sporoiden Substanz auf dem gewöhnlichen Agar — meiner Meinung nach mufs dieser Nährboden dem Milzbrandbakterium ganz besonders günstige Bedingungen bieten, da es auf demselben in der Regel seinen ganzen Entwicklungszyklus durchmacht — in bestimmten Grenzen hält, welche durch das Gröfsenverhältnis der Spore zum Stäbchen bestimmt werden, so dafs eine gewisse Proportionalität derselben, eine bestimmte Relation zwischen der Spore und dem Körper gewahrt wird, wird auf dem Glyzerinagar dieses Verhältnis verwischt, ein übermäfsiges Wachstum der Sporoidsubstanz und der Untergang des Chromatinleibes stellt sich ein.

Diese Änderung des Stoffwechsels hat zur Folge, dafs die durch das Freiwerden der Sporoidkugeln aufgelösten Fäden absterben.

Dafs im Verlaufe der Kultivation eine grofse Menge Bakterien abstirbt, war schon seit langem aus den Arbeiten von Ficker[1]) und London[2]) bekannt. Gottschlich und Weigang[3]) haben gezeigt, dafs dieses Absterben die Folge des auf die grofse anfängliche Vermehrung folgenden Nahrungsmangels ist.

Studiert man irgendeine Kultur längere Zeit hindurch, so bemerkt man, dafs besonders in einzelnen Kulturen das Absterben tatsächlich immens ist; es kommt bei dem Milzbrandbakterium auch auf gewöhnlichem Agar vor. Es liegt vielleicht wirklich am nächsten, sich als die Ursache dieses Absterbens den Nahrungsmangel zu denken. Aber dieses Absterben kann mit dem Untergange der Bakterien auf dem Glyzerinagar nicht verglichen werden. Seine Morphologie ist völlig verschieden. Da sieht man, wie die Fäden dünner, blässer werden, immer mehr von ihrem Chromatin verlieren und schliefslich zu ovalen schwach gefärbten Partikeln

1) Ficker, Zeitschr. f. Hyg., 29, 1898.
2) Arch. des sc. biol. St. Petersbourg VI, 1897.
3) Zeitschr. f. Hyg., 20, 1895.

zerfallen oder schwinden, indem sie sich gänzlich abfärben. (Fig. 1 B, 22.) Der grofse Hungertod der Bakterien unterscheidet sich somit sehr bedeutend von dem Massentode derselben auf dem Glyzerinagar.

In den Büchern über Bakteriologie findet man jedoch noch von einem anderen Absterben der Bakterien Kunde und zwar in alten Kulturen, das nach der landläufigen Auffassung teils durch Erschöpfung der Nährstoffe, teils durch Anhäufung der Stoffwechselprodukte bedingt ist. »Wir sehen dann«, sagt Günther[1]), »an den Bakterienzellen zunächst sogenannte Absterbeerscheinungen, Involutionserscheinungen auftreten. Die Zellen blähen sich auf, werden voluminöser, Mifsbildungen, Schnörkelformen der manigfachsten Gestaltung bilden sich aus, das Protoplasma durchsetzt sich mit »Vakuolen«[2]), verliert seine normalen chemischen Eigenschaften (z. B. färbt sich lückenhaft und schlecht mit Anilinfarbstoffen), der Kontur der Zellen wird undeutlicher; und dann sind die Zellen nicht mehr fähig sich weiter zu vermehren, selbst wenn sie auf frischen Nährboden übertragen werden, sie sind abgestorben.«

Eine analoge Beschreibung, selbst die Vakuolisation nicht ausgenommen, geben Kolle und Hetsch[3]), welche den von Günther angeführten Ursachen dieses Absterbens noch die Änderung in der Reaktion des Nährbodens hinzufügen, die sich in alten Kulturen einstellt und sehr wahrscheinlich von den Stoffwechselprodukten herrührt.

Bei flüchtiger Durchmusterung der meiner Arbeit beigefügten Abbildungen könnte es scheinen, dafs der von mir beschriebene Vorgang der Sporoidkörperbildung mit dem von den ebenzitierten Autoren gemeinten identisch ist. Dem ist jedoch nicht so.

Die Beschreibungen der letztzitierten Autoren beziehen sich auf alte Kulturen, während man die Bildung der sporoiden Körper bereits in 4 bis 5 Tage alten, somit relativ jungen Kulturen mit

1) Günther, a. a. O., S. 16.
2) Anführungszeichen und Fettdruck von Günther selbst
3) Kolle-Hetsch, a. a. O., S. 21.

Sicherheit konstatieren kann. Um diese Zeit sind weder die Nährstoffe des Nährbodens erschöpft, noch hat sich die Reaktion desselben in merklicher Weise verändert, aufserdem besitzt eine solche Kultur noch lange die Fähigkeit sich zu vermehren, wenn sie auf frischen Nährboden gebracht wird.

Schliefslich kann bewiesen werden, dafs die von mir beschriebenen Gebilde keine Vakuolen sind. Die Form derselben ist nämlich nicht immer kugelig, wie es bei einer Vakuole der Fall sein müfste, sie pflegt oft zylindrisch, spindelförmig oder auch unregelmäfsig zu sein, und diese Form bleibt auch dann erhalten, wenn die betreffenden Körper nach Einbufse ihrer Chromatinhülle ganz frei im Präparate liegen. Wenn es sich um Vakuolen handeln würde, so müfsten sie in einem solchen Falle auseinanderfliefsen, oder wenn trotz des Chromatinschwundes ihnen eine zähere Membran übrigbliebe, so müfsten sie, bekannten physikalischen Gesetzen folgend, wenigstens Kugelform annehmen. Da dies jedoch nicht der Fall ist, so mufs geschlossen werden, dafs die sporoiden Elemente keine Vakuolen sind, sondern aus einer festeren Substanz bestehen, welche — wie ich eben gezeigt habe, einer Transformation der, auch normal den Milzbrandbazillus zusammensetzenden Nukleinsubstanz entspricht. Aus meinen Beobachtungen geht freilich hervor, dafs die sporoiden Kugeln tot sind. Trotzdem ist die Substanz derselben, wie aus der mikrochemischen Untersuchung hervorgeht, kein Reservestoff, sie ist — wie uns die histologische Untersuchung ihres Entwicklungsvorganges belehrt, umgewandelte Bakterienkörpersubstanz, denn das Chromatin weicht nicht blofs vor ihr zurück, um einfach zu atrophieren, wenigstens nicht in der Zeit, da die Sporoidkörperbildung in voller Blüte ist, sondern wandelt sich selbst zur Sporoidsubstanz um. Nur ein verhältnismäfsig kleiner Teil des Chromatins geht unter Zerfall und Auflösung zu Grunde.

Aber die Art der Entwicklung zeigt, dafs die Ursache des Absterbens hier eine andere sein mufs als Nahrungsmangel. Da sich die Sporoidkörper auf einem Nährboden entwickeln, auf welchem die Ernährung des Bact. anthracis stärker ist, wo es üppiger wächst und stärker hypertrophiert, so bleibt wohl nur

noch der Schlufs übrig, dafs das Absterben des Milzbrandbakteriums auf dem Glycerinagar die Folge einer Überfütterung ist.

Hiermit gelangen wir jedoch zu einem Punkte, der zur Erklärung der Bedeutung der Sporoidkörperbildung beizutragen vermag.

Alles, was ich nämlich bis jetzt angeführt habe, bringt mich zu der Überzeugung, dafs das Milzbrandbakterium auf dem Glyzerinagar in einen Zustand gerät, welcher mit den Depressionszuständen der Protozoen analog ist.

Um dies näher darzulegen, wolle man sich erinnern, wann der Depressionszustand bei den Protozoen eintritt und wodurch derselbe charakterisiert wird.

Nach Calkins und Rich. Hertwig kommt es bei reichlicher Fütterung der Protozoen, also bei ununterbrochener Assimilationstätigkeit, trotz fortlaufender Teilungen, durch welche die Kernsubstanz doch eine Reduktion erfährt, zu einem Riesenwachstum der letzteren. Bei dem Actinosphärium, bei welchem R. Hertwig[1]) diese »physiologische Degeneration« festgestellt hat, resultieren schliefslich Tiere, deren Kerndurchmesser die zehnfache Gröfse des normalen erreichte, so dafs sich die Kernsubstanz etwa tausendfach vergröfsert hat. Das Ende dieses Prozesses war jedoch stets dasselbe. Die Riesenkerne wurden ausgestoßen, das zurückbleibende Protoplasma enthielt dann keine Kerne mehr und starb bald ab. Der Tod ist durch eine Störung des cytotypischen Wachstums, durch eine Störung der normalen Kernplasmarelation bedingt, durch welche das Gleichgewicht der Substanzen in der Zelle so irritiert wird, dafs eine weitere Assimilation und in weiterer Konsequenz auch das fernere Wachstum und die Vermehrung unmöglich sind.

Solchermaßen wäre unter den angeführten Verhältnissen die Art der Vernichtung preisgegeben, wenn es nicht gelingen würde, die Assimilationsfähigkeit durch Verkleinerung der hypertro-

1) R. Hertwig, Über physiol. Degeneration bei Actinosphaerium Eichhornii, Festschr. f. Haeckel, 1904.

phierten Kernsubstanz zu reaktivieren, was durch Befruchtung oder Encystierung erreicht wird.

Solcherweise stellt sich die amphigene Entwicklung (bei welcher durch Zusammenfliefsen von Individuen die normale Kernplasmarelation restituiert wird) als ein Kompensationsvorgang, als ein zellulärer Regulationsvorgang, in einen gewissen Gegensatz zu der autogenen Entwicklung (bei welcher es sich um Umwandlungen aus »eigenen Mitteln« eines Individuums handelt).

Übersieht man nun die Entwicklung des Bact. anthracis, so sehen wir, dafs es ein Organismus mit autogener Entwicklung ist; bislang ist keine Tatsache bekannt, welche zu der Annahme berechtigen würde, dafs auch dieses Bakterium eine amphigene Entwicklung besitzt, dafs bei demselben ein, sei es noch so primitiver, sexueller Vorgang vorkommt. Ich habe bis jetzt trotz unzähliger Beobachtungen nicht die geringste Spur des Vorhandenseins eines Vorganges feststellen können, der auch nur entfernt der von Schaudinn bei dem Bac. Bütschli beschriebenen Autogamie geähnelt hätte.

Dauernde autogene Entwicklung führt jedoch, wie R. Hertwig bei einer Reihe von Protozoen in überzeugender Weise gezeigt hat, zu einer Störung der Kernplasmarelation und zwar nach der Richtung hin, dafs die Kernsubstanz auf Kosten des Cytoplasmas anwächst.

Was beobachtet man nun bei dem Milzbrandbakterium?

Auf einem Nährboden, auf welchem sein ganzer Entwicklungszyklus zur Entfaltung gelangt und welcher daher als ihm entsprechend angesehen werden mufs, z. B. auf dem gewöhnlichen Agar, beobachtet man, dafs nach einer Reihe durch autogene Entwicklung, d. h. vegetative Teilungen zustande gekommener Generationen sich gleichzeitig die Bildung gekrümmter, mäfsig hypertrophischer, stets hyperchromatischer Fäden und Sporen einstellt.

An dieser Stelle sei es mir gestattet, einige Worte jenen gekrümmten, oft knäuelförmigen und hyperchromatischen Formen zu widmen. Es sind dies die sog. Involutionsformen. Von diesen

wird oft behauptet, dafs es Absterbeformen sind, was mit einer anderen Behauptung übereinstimmt, dafs sie nämlich dem Nahrungsmangel und Anhäufen von Stoffwechselprodukten ihre Entstehung verdanken. Dieser Behauptung widersetze ich mich; vor allem verfüge ich über Beobachtungen, welche mit denjenigen von Behring[1]) übereinstimmen, aus denen hervorgeht, dafs diese Formen in wenige Tage alten Kulturen auftreten können, in welchen die erwähnten Entstehungsbedingungen nicht erfüllt sein können; des weiteren habe ich beobachtet, dafs die »Involutionsformen« aus Kulturen, in denen sie entstanden sind, verschwanden, um erst später wieder aufzutauchen, während die Kultur unterdes von Sporen geradezu überschwemmt wurde.

Meiner Ansicht nach führt weniger der Nahrungsmangel zur Entwicklung der »Involutions«formen, als jenes Moment, das A. Fischer[2]) in den Worten »Involutionsformen bilden alle Bakterien, wenn sie längere Zeit in ihnen nicht zusagenden Bedingungen[3]) leben müssen« — wenn auch unklar zum Ausdruck gebracht hat. Nicht zusagende Bedingungen müssen eben nicht gerade Nahrungsmangel oder die Sättigung des Nährbodens mit schädlichen Stoffwechselprodukten sein.

Dafs auch von einer Wirkung derartiger Produkte keine Rede sein kann, geht aus meinen Beobachtungen hervor, nach welchen auf einem Nährboden, der besonders fruchtbar war auf »Involutionsformen«, die Entwicklung des Milzbrandbakteriums noch möglich ist. Es handelt sich um folgende Beobachtungen.

Eine alte Milzbrandkultur, welche eine grofse Menge »Involutionsformen« und eine Anzahl Sporen enthielt, wies nach Ablauf von weiteren 14 Tagen aufserordentlich viel weniger »Involutionsformen«, neben den Sporen jedoch auch viele ganz neue Fäden auf; diese neuen Fäden sind in der Zeit nach der Ausbildung einer grofsen Anzahl von »Involutionsformen« entstanden; somit konnte eine Sättigung des Nährbodens mit Stoffwechselprodukten, welche eine normale Entwick-

1) Behring, Zeitschr. f. Hyg., VIII, 1889.
2) A. Fischer, Vorles. über Bakterien, 1903, S. 46.
3) Von mir gesperrt.

lung unmöglich machen, keinesfalls die Ursache der Entstehung jener Formen sein.

Die zweite Beobachtung betrifft den Umstand, dafs — wie ja oft behauptet wird — die »Involutionsformen« schlecht färbbar sind. Diese Behauptung hat nur relative Geltung. Die auf Absterben hinweisende, schlechte Färbbarkeit stellt sich bei den »Involutionsformen« zumeist erst in späterer Zeit ein. Zur Zeit, da ihre Bildung den Gipfelpunkt erreicht hat, habe ich stets das direkte Gegenteil von jener Behauptung konstatieren können: die »Involutionsformen« waren vorwiegend hyperchromatisch und blieben es oft sehr lange. Zieht man weiterhin gleichzeitig in Betracht, dafs diese Formen regelmäfsig auch hypertrophisch zu sein pflegen — auch A. Fischer sagt: »Aber aufser Rand und Band geratenes Wachstum ist es doch gewifs, was die aufgeblähten, gabeligen und anderen Mifsgestalten der Involutionsformen hervorbringt.«[1]) — so fällt dadurch, meiner Meinung nach, auch jene zweite Annahme, dafs nämlich dieselben durch Nahrungsmangel entstehen, hin. Hypertrophie kann doch wohl nur durch erhöhte Assimilation hervorgebracht werden.

Tatsächlich sind auch jene hypertrophischen Formen (so will ich fernerhin, wie ich glaube, richtiger, die »Involutionsformen« nennen) zur Zeit ihrer vollsten Entwicklung keine Absterbeformen, sondern sie leben. Bereits Behring[2]) und Kruse[3]) haben die Beobachtung gemacht, dafs die »Involutionsformen« asporogener Milzbrandbazillenstämme mehrere Wochen lang lebens- und vermehrungsfähig bleiben; auf frischen Nährboden übertragen, wachsen sie rasch auf.

Ich selbst habe den folgenden Versuch ausgeführt:

Eine 8 Tage auf Glyzerinagar bei 37° gezüchtete Kultur enthielt Haufen freiliegender Sporoidkörper und daneben Bakterien von nur hypertrophischen Formen; normale fand ich überhaupt nicht. Durch Überimpfung auf Lithiumagar nach der

1) A. Fischer, a. a. O., S. 49.

2) Behring, Zeitschr. f. Hygiene, 8. 1889.

3) Kruse, Flügges Mikroorganismen, 3. Aufl., I, S. 60, 1896.

Vorschrift von Gamaleia wurde eine typische Anthraxkultur erhalten. Die Vitalität der hypertrophischen Formen ist hierdurch bewiesen.

Meiner Ansicht gemäfs mufs das Auftreten der hypertrophischen Formen eine wesentlich andere Deutung erfahren. Zu diesem Zwecke erscheint es notwendig, auf das Verhältnis der hypertrophischen Formen zu den Sporen einzugehen.

Diesbezüglich kann man die Beobachtung machen, dafs diese beiden morphologischen Gebilde entweder gleichzeitig oder in so kurzen Zeitintervallen hintereinander in der Kultur auftreten, dafs sie zumeist nebeneinander getroffen werden. Erinnern wir uns an die Ausführungen des ersten Kapitels der vorliegenden Arbeit, nach welchen die Spore ein Produkt des morphologischen Metabolismus der das Bakterium zusammensetzenden Substanz ist, dafs sie auf Grund von Assimilationsvorgängen durch eine chemische Umwandlung des Bakterienchromatins entsteht, so werden wir es ganz begreiflich finden, dafs dieser Vorgang von einer Hypertrophie der Stäbchen begleitet wird. Mit dieser Beobachtung steht auch der Umstand im Einklange, dafs — wie ich feststellen konnte — das letzte Glied des Entwicklungszyklus der asporogenen Milzbrandstämme eben die hypertrophischen Formen bilden; zur Ausbildung der Sporen kommt es eben nicht mehr.

Meiner Ansicht nach wird also durch die Bildung der Sporen das Wachstum des Chromatinkörpers reguliert. Übereinstimmend damit wird zugestanden, dafs zur Bildung der Sporen eine vorausgegangene gute Ernährung der Bakterien notwendig ist (z. B. A. Fischer[1]).

Wie ich bereits früher bemerkt habe, bilden sich in den durch Teilung sich vermehrenden Stäbchen, freilich in sehr beschränkter Anzahl, die Dietrich-Liebermeisterschen Körner, deren Substanz alle Reaktionen der Sporensubstanz gibt. Wenn sich unter gewissen äufseren Bedingungen, unter welchen die Entwicklung der Sporen zur Beobachtung gelangt, der Stoff-

1) Fischer, a. a. O., S. 42.

wechsel des Bakteriums steigert, — und dafs sich derselbe steigert, ist aus dem von Meyer[1]) gemachten Befunde, dafs vor der Sporenbildung alle im Keimling angesammelten Reservestoffe verbraucht werden, zu ersehen — so wird mehr Chromatin gebildet. Dementsprechend kommt es zur Ausbildung der Hyperchromasie und Hypertrophie der Stäbchen. Steht jedoch das Bakterium unter ihm voll zusagenden Bedingungen, wie dies z. B. für das Milzbrandbakterium auf dem gewöhnlichen Agar, auf dem es, wie bereits öfter erwähnt wurde, seinen ganzen Entwicklungszyklus durchmacht, der Fall ist, so übersteigt die Chromatinbildung eine bestimmte, nicht sehr hoch gelegene, physiologische Grenze nicht, da es sofort zur Sporenbildung kommt. Die Spore wächst bis zu einer bestimmten Gröfse, welche in einem konstanten Verhältnis zu der Körpergröfse des Bakteriums bleibt, in welchem sie entstanden ist. Zwischen der Körper- und der Sporengröfse existiert eine ganz bestimmte quantitative Beziehung, die man als Sporenkörperrelation bezeichnen könnte. Die fertigen Sporen befinden sich in Bakterien von bestimmter Gröfse, und diese Gröfse ist ebenso konstant, wie die Gröfse der Spore. Eben weil diese Gröfse konstant ist, geht der Rest des Bakteriums durch Zerfall zugrunde und läfst keine zweite, etwa kleinere Spore, entstehen. Deshalb gehen jene hypertrophischen Formen, die aus welchen immer Ursachen keine normalen Sporen auszubilden vermochten, zugrunde, wie aus ihrer schlechten Färbbarkeit hervorgeht. Und so kann man in diesem Sinne, bei Auffassung der Sporenbildung als regulativen morphochemischen Vorgang auf das Wachstum des Chromatinkörpers, auch die Spore für eine Art von Cyste halten, wie dies z. B. Kruse[2]) getan, da ja auch viele Protozoen durch Enzystierung ihre gestörte Kernplasmarelation regulieren.

Aus alledem geht vor allem hervor, dafs zur Sporenbildung durchaus kein teleologisches Moment notwendig ist, wie z. B. Kolle-Hetsch[3]) voraussetzen. Die Sporenbildung ist einfach

1) Meyer, a. a. O.

2) Kruse, a. a. O., 1896.

3) Kolle-Hetsch, a. a. O., 110.

das Resultat des Stoffwechsels des Bakteriums unter bestimmten äufseren und inneren Bedingungen. Dafs aber die inneren Bedingungen die Zweckmäfsigkeit dieses Vorganges nicht bestimmen, ersieht man aus der Bildung der Sporoidkörper, bei welcher die Zusammensetzung des Bakteriums gleich bleibt und nur andere äufsere Bedingungen eingetreten sind — das Resultat aber ist der Arterhaltung nicht mehr zweckdienlich.

Ich habe oben den Ausspruch getan, dafs das Milzbrandbakterium auf dem Glyzerinagar in einen Zustand gerät, welcher dem Depressionszustande der Protozoen analog ist.

Auf Grund der Aussagen, welche ich über die Sporenbildung als Regulationsvorgang der unter günstigen Lebensbedingungen zustande gekommenen Hypertrophie des Chromatinkörpers getan habe, kann man ein tieferes Verständnis der Sporoidkörperbildung anzubahnen versuchen.

Vor allem nimmt man wahr, dafs diese Körper in ihren Anfangsstadien völlig denjenigen Körnchen gleichen, aus welchen auf gewöhnlichem Agar die Sporen entstehen; bald bemerkt man jedoch, dafs in einzelnen Stäbchen eine gröfsere Anzahl solcher Körnchen gebildet wird, als man in sporulierenden Bakterien zu sehen gewohnt ist. Und da tritt sofort eine neue Erscheinung vor unsere Augen; es kommt zu einer beschleunigten Teilung, so dafs nahezu isodiametrische, »kokkenförmige« Gebilde zustande kommen, deren jedes je ein sporoides Körnchen enthält. Es liegt auf der Hand, dafs durch solche Teilung die Wahrung der Proportionalität zwischen Körper und Sporoidkorngröfse erzielt wird; solange die Möglichkeit einer solchen Teilung gegeben ist, erhält sich die konstante Relation zwischen der Menge der Sporoid- und Bakterienkörpersubstanz; zugleich ergibt sich hieraus, dafs zu dieser Zeit die zwar erhöhte Assimilationstätigkeit sich noch immer im normalen Geleise bewegt.

Später beobachtet man, dafs das Wachstum der sporoiden Körper als Folge nach sich zieht, dafs diese Körper von Chromatinquerscheidewänden durchzogen werden, und dafs oft der ganze Bazillus, der ganze Faden durch Querscheidewände in sehr kleine (Fig. 7, 8) Teile zerlegt erscheint — eine Tatsache, auf

die ich schon früher aufmerksam gemacht habe[1]), und welche, anthropomorphistisch gesprochen, den Eindruck hervorruft, als wenn sich der Faden von den gebildeten Sporoidkörpern durch Abschnürung befreien wollte. Da jedoch der Stoffwechsel erhöht ist, so genügt die beschleunigte Teilung nicht zur Wiedererreichung der Normalrelation der beiden in Frage kommenden Substanzen. Da sieht man, wie sich im Faden lokale Hyperchromasien einstellen, wie die Fäden dicker werden und Scheinfäden auftreten. Nicht nur also ist die Assimilation gesteigert, sondern, wie das Auftreten der Scheinfäden beweist, die Vermehrung durch Teilung erniedrigt; aber die normale Relation der Chromatin- und Sporoidsubstanz wird dadurch nicht erreicht. Die Hypertrophie des Chromatinkörpers erlangt stets gröfsere Dimensionen, desgleichen wachsen auch die Sporoidkörper an Gröfse und Zahl. Es ist klar, dafs die Entwicklung des Bakteriums in einen verhängnisvollen Circulus vitiosus geraten ist. Da sich gleichzeitig bei einzelnen Fäden auch eine Abfärbung des Chromatins kundgibt, so ist es offenbar, dafs die Assimilation sistiert ist. Um diese Zeit habe ich in meinen Präparaten des öfteren Formationen beobachtet, die darauf hinzuweisen scheinen, dafs es auch zum Verschmelzen einzelner nebeneinanderliegender Chromatinindividuen kommt, ein Vorgang, der gleichfalls als Regulation der exzessiven Sporoidkörperbildung aufgefafst werden kann. Ich kann jedoch keineswegs behaupten, dafs wir es hier mit einem Analogon der Konjugation von Protozoen zu tun haben, da alle diese Versuche, das Wachstum durch Reaktivierung des normalen Verhältnisses der Chromatin- und Sporoidsubstanz zu regulieren, in diesem Stadium fehlschlagen. Vergeblich bilden sich die bizarrsten, mit auffallender Hyperchromasie verbundenen Hypertrophien der Bakterien aus; denn nach kurzem Bestehen bildet sich auch in ihnen die sporoide Substanz und zwar in einer ungeregelten und im weiteren Verlaufe zum Zerfall der hypertrophischen Formen infolge der auf Grund der sistierten

1) Vlad. Růžička, Arch. f. Hyg., Bd. 47, 1903. Tafel II, Fig. 1, 4, 18. — Arch. f. Hyg., Bd. 51, 1904, S. 292.

Assimilation auftretenden Atrophie des Chromatins im Sporoidkörper von verschiedener Gröfse führenden Weise.

Dieser Circulus vitiosus kann in einzelnen Kulturen von dem Auftreten einer diminuierten Generation unterbrochen werden, deren Ausbildung auf Grund des Angeführten nicht mehr unbegreiflich erscheinen dürfte. Doch selbst diese, wie man schliefsen könnte, den Ernährungsverhältnissen bereits angepafste Generation erscheint unfähig, arterhaltende Elemente herauszubilden. Nach den eruierten Prinzipien kann geschlossen werden, dafs auch sie nicht imstande ist, eine ihrer Gröfse adäquate Menge Sporensubstanz auszubilden. In der Tat sehen wir sie durch Ausbildung von Sporoidsubstanz zugrunde gehen.

Die ganze Kultur besteht schliefslich nur aus sporoiden Kugeln, denen hie und da Reste der Chromatinbakterienkörper beigemischt sind. Die sporoiden Kugeln sind tot —; wie ich oben dargelegt habe, bilden sie nicht etwa hypertrophierte Homologa von Sporen. Die Kultur stirbt schliefslich ab (Vers. Nr. 23, 26, 29).

Die Analogie mit den Depressionszuständen der Protozoen tritt in den folgenden Momenten zutage:

1. in der erhöhten Assimilationstätigkeit,
2. in der aufsergewöhnlichen Vermehrung einer von den Substanzen, durch deren Proportionalität der normale Lebensverlauf des Bakteriums verbürgt wird,
3. in dem Zugrundegehen der ganzen Kultur, zu welchem es kommt, wenn nicht ein derartiger Wandel im Stoffwechsel eintritt, dafs dadurch die Reaktivierung der normalen Sporenkörperrelation ermöglicht wird.

Diesen Punkten erlaube ich mir, einige Bemerkungen anzuschliefsen.

Es ist klar, dafs durch die sozusagen gesteigerte autogene Entwicklung auf dem Glyzerinagar infolge erhöhter Assimilation eine mächtige Störung der Sporenkörperrelation erfolgt, ebenso wie bei den Protozoen unter derartigen Umständen eine Störung der Kernplasmarelation eintritt.

Bei den letzteren beruht diese Störung nach den Befunden von R. Hertwig auf dem übermäfsigen Wachstum der Kernsubstanz.

Bei dem Bact. anthracis kommt es zu einem Riesenwachstum der Sporoidsubstanz. Diese Substanz verhält sich bei den von mir in dieser Arbeit besprochenen Regulationsvorgängen analog wie die Kernsubstanz bei den Protozoen.

Daraus kann nun freilich keinesfalls der Schlufs gezogen werden, dafs die Sporoidsubstanz des Milzbrandbakteriums der Kernsubstanz desselben entspreche. Eine solche Behauptung würde im Gegenteile völlig sichergestellten mikrochemischen Tatsachen widersprechen.

Ich habe diese Frage bereits bei Besprechung der morphologischen Analogien, welche zwischen Protozoenkernen und Bakteriensporen bestehen, berührt und dargetan, dafs diese Analogien eben nur äufserliche sind, da sowohl die Sporen als auch ihre Mutterelemente, die Bakterienkörper, aus Kernsubstanzen bestehen.

Bei der Regulationsstörung, welche sich durch exzessives Wachstum der Sporoidsubstanz kundgibt, kommt übrigens selbst diese äufsere Analogie mit dem Zellkern überhaupt gar nicht in Betracht, weil die Sporoidkörper dadurch von den Sporen differieren, dafs in ihrer Entwicklung ein in Analogie der Zellkerne färbbares Stadium in der Regel nicht vorkommt.

Der Regulationsvorgang trägt in unserem Falle einen ganz anderen Charakter zur Schau als bei der autogenen Entwicklung der Protozoen. Doch darauf werde ich später zurückkommen.

An dieser Stelle nur mehr einige Worte zur näheren Analyse der Tatsache, dafs das abnormale Wachstum der Sporoidsubstanz zur Vernichtung der Kultur führen kann. Die letztere Tatsache bezeugen die Versuche Nr. 23, 26, 29, in welchen ich vergeblich versucht habe, aus sporoiden Kugeln auf verschiedenen Nährböden neue Kulturen heranzuzüchten, sowie die direkte Beobachtung dieser Elemente in mikroskopischen Kulturen, in welchen sie unverändert geblieben sind.

Dem gegenüber erscheint es notwendig, sich jener Versuche (Nr. 15. 16, 25, 32) zu erinnern, in welchen Teilchen einer nur aus sporoiden Kugeln bestehenden Kultur bei der Überimpfung nur auf einem der ihnen gebotenen Nährböden, und zwar übereinstimmend in allen diesen Versuchen, nur auf dem gewöhnlichen Agar angegangen sind.

Ich habe mich bereits dahin geäufsert, dafs dieses Resultat in Ansehung der Tatsache, dafs das Milzbrandbakterium auf dem Glyzerinagar ein üppigeres Wachstum entfaltet, paradox erscheinen könnte. Denn, ist das letztere der Fall, so könnte man sich fragen, wie ist es möglich, dafs gerade auf dem Glyzerinagar keine der Kulturen angegangen ist, während sie auf dem gewöhnlichen Agar, das im Verhältnis zum Glyzerinagar keine so günstigen Ernährungsbedingungen gewährt, üppig aufwuchsen?

Dieses Resultat bietet jedoch nur auf den ersten Blick eine Überraschung.

Die Art, in welcher ich die in dem überimpften Kulturteilchen enthaltenen Elemente bestimmt habe, ist freilich nicht imstande, alle Zweifel zu bannen, ob doch nicht welche vermehrungsfähige vegetative Stäbchen oder Sporen mit übertragen worden sind, die auf dem frischen Nährboden hätten weiterwuchern resp. auskeimen können. Aber diese so naheliegende Eventualität wird eben durch das oben mitgeteilte Resultat der Versuche Nr. 15, 16, 25, 32 ausgeschlossen.

Man kann doch nicht annehmen, dafs es der Zufall konstant gewollt hätte, dafs eben diese lebensfähigen Elemente bei der Überimpfung stets nur auf den gewöhnlichen und niemals auf den glyzerinhaltigen Agar gelangt sind. Die Konstanz dieses Ergebnisses schliefst gewifs einen solchen Zufall aus. Aufserdem steht zu erwägen, dafs das Wachstum auf dem gewöhnlichen Agar regelmäfsig so üppig war, wenn es auch oft erst verhältnismäfsig spät anhob, dafs man — wenn die üblichen Erfahrungsschlüsse in Anwendung kommen sollten — nur schliefsen könnte, dafs eine grofse Anzahl von entwicklungsfähigen Keimen übertragen werden mufste. Mit Hinblick auf

diesen Umstand gewinnt auch das negative Resultat der mikroskopischen Untersuchung des zur Verimpfung gelangten Kulturteilchens einen gewissen Beweiswert. Aufserdem mufs ich jedoch darauf aufmerksam machen, dafs in einigen der zitierten Versuche (Nr. 15, 16) auch auf dem Glyzerinagar eine anfängliche Vermehrung stattgefunden hat. Ich konnte in diesen Fällen hypertrophische und normale Formen, freilich alles magerer als in der Norm, feststellen; doch wurde das Wachstum offenbar dadurch vernichtet, dafs die neugebildeten Individuen mehr als zulässig Sporoidsubstanz gebildet haben und infolge dessen, nachdem die Assimilation solchermafsen unmöglich gemacht worden ist, zugrunde gegangen sind.

Ich bin der Meinung, dafs eben diese Beobachtung uns in die Lage versetzt, das ganze Problem verstehen zu lernen.

Ich habe schon früher aufmerksam gemacht, dafs mit den sporoiden Körpern auch eine gewisse Menge von Chromatinkörperresten zur Verimpfung gelangt. Aus der zitierten Beobachtung, dafs es auch auf dem Glyzerinagar zur Entwicklung einer Anzahl von Individuen kommen kann, mufs in Gemeinschaft mit den oben angedeuteten Momenten geschlossen werden, dafs die Entwicklung von gewissen solchen Chromatinkörperresten ausgeht.[1]) Fig. 26 stellt vielleicht die Art und Weise dieser Entwicklung dar. Die entstandenen Individuen sind bedeutend dünner als die normalen, es ist klar, dafs sie sich rege teilen, da sie aus sehr kurzen Gliedern gebildete Ketten hervorbringen. Ohne den Tatsachen Gewalt anzutun, kann man schliefsen, dafs die Entwicklung infolge erhöhter Assimilation durch Einwirkung des Nährbodens zustandegekommen ist. Da sich aber sofort die Bildung von sporoiden Körpern eingestellt hat, so kommt der bereits bekannte Circulus vitiosus in Gang, und die angegangene Saat geht im Depressionszustande zugrunde.

Auf dem gewöhnlichen Agar kommt es gleichfalls zur Vermehrung des Chromatins; die entstandenen Fäden sind zwar

1) Schon Kruse (a. a. O.) hielt derartige Reste in alten Kulturen bei Übertragung auf frisches Substrat für regenerationsfähig. Einen Beweis hat er für diese Annahme nicht geliefert.

gleichfalls dünner, aber sie besitzen auch doch reichlich Chromatin; da jedoch die assimilatorischen Vorgänge auf diesem Nährboden nicht so gesteigert sind als auf dem Glyzerinagar, so ist auch die Bildung der Sporoidkörper nicht gesteigert, sondern es kommt im Gegenteile zur Reaktivierung der normalen Sporenkörperrelation und infolgedessen zum normalen Wachstum.

Eine analoge Erklärung setze ich auch bei dem Resultate des Versuches Nr. 24 voraus, in welchem aus dem Blute des am 4. Tage nach der Verimpfung mit einer nur sporoide Körper enthaltenden Kultur ein völlig typisches Milzbrandbakterium in reichlicher Kultur gewonnen werden konnte. Aus diesem Versuche geht hervor, dafs das Wachstum von einem mit allen Artmerkmalen des Bact. anthracis ausgestatteten Teilchen ausgehen mufste, da selbst die Virulenz bewahrt war. Des weiteren geht aus demselben hervor, dafs die Behauptung, dafs gewisse tierische Organismen ein ausnehmend günstiges Nährsubstrat für unser Bakterium abgeben, nur mit einer gewissen Beschränkung gelten kann. Meiner Ansicht gemäfs gleicht der tierische Organismus in dieser Beziehung nicht einmal dem gewöhnlichen Agar, weil das Milzbrandbakterium wahrscheinlich wegen Mangel an freiem Sauerstoff und wohl auch aus anderen Ursachen nicht imstande ist, in demselben seinen ganzen Entwicklungszyklus durchzumachen. Der tierische Organismus zwingt das Milzbrandbakterium durch fortgesetztes Wachstum seines Chromatinkörpers in unnatürliche Lebensverhältnisse. Dasselbe lebt im Tiere unter ähnlichen Verhältnissen wie die in den Flechten symbiotisch mit Pilzen lebenden Algen. Auch diese Algen sind, solange sie in dieser Lebensgemeinschaft verharren, aufser stande, sich sexuell zu vermehren, sie tun dies nur auf vegetativem Wege. Ich stimme vollkommen mit Němec[1]) überein, wenn er diese Verhältnisse als ungesunde bezeichnet.

Ich schliefse dieses Kapitel mit dem Hinweise auf die weitreichende Bedeutung der Regulationsvorgänge, welche ich in

1) Němec, Vztahy rostlin kzevnímu světu. Prag, 1907.

demselben besprochen habe. Des weiteren halte ich es für angezeigt, auf jene charakteristische Eigenschaft dieser Regulationsvorgänge hinzuweisen, welche darin beruht, dafs das Auftreten oder Ausbleiben derselben direkt von der Einwirkung äufserer Faktoren abhängt.

Ich halte diese Feststellung deshalb für notwendig, weil Driesch eben in der Zweckmäfsigkeit der Regulationen ein aus mechanischen Ursachen unerklärliches Moment erblickt. Dafs es sich eher um eine Komplexität, als um eine Unerklärlichkeit der Erscheinungen handelt, zeigen die eben angeführten Regulationen des Bact. anthracis doch deutlich genug.

## VI. Der eigentliche Charakter der Regulationsvorgänge des Bact. anthracis.

Der Depressionszustand von Protozoen beruht nach den Entdeckungen R. Hertwigs auf einer solchen Störung der Kernplasmarelation, infolge welcher die Kernsubstanz riesige Dimensionen erlangt und in ein grofses quantitatives Mifsverhältnis zur Zellkörpersubstanz gerät.

Das von Strafsburger geahnte, von Gerassimov und Heidenhain zum erstenmale richtig erfafste und von R. Hertwig präzis formulierte und detailliert ausgearbeitete Gesetz der Kernplasmarelation ist für sehr viele Organismen in einer Weise begründet worden, welche dasselbe zu einem anerkannten allgemeinen biologischen Grundprinzip erhoben hat.

Nachdem dieses Gesetz bereits vielfach zur Erklärung verschiedener physiologischer Vorgänge und besonders so manchen embryogenetischen Geschehens herangezogen worden ist, so erscheint es mir notwendig, in Konsequenz meiner Beobachtungen und Versuche über das Milzbrandbakterium darauf hinzuweisen, dafs dieses Gesetz Ausnahmen zuzulassen scheint, welche geeignet sind, das Prinzip desselben näher zu definieren.

Sollte das Gesetz der Kernplasmarelation allgemeine Geltung besitzen, so dürfte es keine Organismen geben, die nur aus Kernsubstanzen bestehen.

Welche Momente sprechen nun dafür, dafs das Milzbrandbakterium blofs aus solchen Substanzen gebildet ist?

Aus meinen Arbeiten ergeben sich die folgenden Momente:

Die von mir in den Bakterien beobachteten Strukturen sind mit denen von Korschelt bei Raupenkernen beschriebenen kongruent; die Mannigfaltigkeit dieser Strukturen konnte ich durch Feststellung ihrer Wandelbarkeit bei Beobachtung unter Benutzung der intravitalen Färbung erklären.

Die Färbbarkeit der Bakterien entspricht derjenigen der Gewebszellkerne; beide sind amphophil-basophile Objekte. Ein Unterschied gibt sich darin kund, dafs die Basophilie der Bakterien etwas niedriger ist als diejenige der Zellkerne; noch tiefer steht die Basophilie der Bungeschen, am tiefsten die der Krompecherschen Körperchen. Diese Gebilde verhalten sich somit nicht wie Bakterienkerne, sondern eher wie Nukleolen, d. h. Teile der Kernsubstanz.

Durch chemische Analyse gelang es mir, in dem Milzbrandbakterium bis 70% Nuklein nachzuweisen; bei dieser Analyse geht jedoch eine grofse Menge Nuklein verloren, so dafs die erzielte Zahl keine entscheidende Bedeutung zu beanspruchen vermag.

Durch mikrochemische Untersuchung habe ich in Erfahrung gebracht, dafs sich die vegetativen Stäbchen des Bact. anthracis bei der künstlichen Magensaftverdauung überhaupt nicht verändern, woraus geschlossen werden mufs, dafs sie durchgehends aus Kernsubstanz bestehen. Auch die Bungeschen und Krompecherschen Körper bleiben erhalten, so dafs sie nicht für Bakterienkerne erklärt werden können. In chromatinolytischen Stoffen lösen sich auch die Milzbrandbakterien entweder ganz oder wenigstens der Inhalt derselben auf.

Dafs auch die Sporen nicht als Bakterienkerne gelten können, habe ich bereits oben dargetan.

Nunmehr erscheint es am Platze, sich daran zu erinnern, was ich über den Depressionszustand des Milzbrandbakteriums früher angegeben habe.

Sind die an jener Stelle gezogenen Schlüsse richtig — und ich bin überzeugt davon, dafs sie richtig sind, — denn

1. erklären sie am besten meine neuen Beobachtungen,
2. bringen sie zahlreiche, sonst gegensätzliche, ältere Beobachtungen mit denselben und auch untereinander in Übereinstimmung,
3. bringen sie die Bakterien bezüglich der allgemeinen biologischen Gesetze in Einklang mit den Protozoen —

sind also jene Schlufsfolgerungen richtig, so ergeben sich aus denselben sehr interessante und wichtige Konsequenzen bezüglich des allgemein biologischen Charakters des Milzbrandbakteriums.

Diejenigen, welche der Annahme huldigen, dafs die kleinen färbbaren, in den Bakterien enthaltenen Körnchen Kerne darstellen, vermögen die leicht zu beobachtende Tatsache, dafs diese Körnchen gleichgrofs bleiben, möge der Bakterienkörper noch so sehr wachsen, absolut nicht zu erklären. Man kann sehr lange Bazillen, beinahe schon Scheinfäden, finden, welche 1—2 solche Körnchen enthalten, geradeso wie 8—10 mal kleinere Stäbchen, wobei sie auch genau dieselbe Gröfse wie in den letzteren besitzen.

Dieses Verhalten widerspricht vollkommen dem Gesetze der Kernplasmarelation, das für alle einzelligen Organismen Geltung hat.

Wie meine Beobachtungen über die Entwicklung des Milzbrandbakteriums auf den Glyzerinagar zeigen, so darf man aus diesem Widerspruche nicht etwa folgern, dafs die der Kernplasmarelation der Protozoen analoge Sporenkörperrelation für die Bakterien keine Geltung habe.

Im Gegenteile ergeben sich aus meinen Beobachtungen die folgenden Konsequenzen:

Vor allem ist es klar, dafs die autogene Entwicklung nicht bei allen Organismen zu einer solchen Störung führen mufs, bei welcher die Kernsubstanz auf Rechnung des Cytoplasmas anwüchse. Bei dem Bact. anthracis sehen wir im Gegenteile unter solchen Bedingungen freilich auch eine Kernsubstanz exzessiv

anwachsen, jedoch ist dies keine Chromatin-, sondern eine Achromatin-, Lininsubstanz, während die (Chromatin-) Körpersubstanz in das Minoritätsverhältnis gerät. Auf Grund mikrochemischer Untersuchungen kann mit Sicherheit behauptet werden, dafs die Regulationen des Milzbrandbakteriums niemals den Rahmen der Kernsubstanzen überschreiten. Und dies ist natürlich, sofern man zugibt, dafs das Milzbrandbakterium allein nur aus Kernsubstanzen besteht. Wenn ein Cytoplasma in demselben zugegen wäre, müfste dessen Gegenwart bei den besprochenen Regulationsvorgängen offenbar werden. Das ist nicht der Fall, weil kein Cytoplasma da ist. Das Studium der angedeuteten Regulationsvorgänge führt somit zu demselben Resultate, zu welchem mich auch die histologischen und mikrochemischen Studien hingeleitet haben, dafs nämlich das Milzbrandbakterium einem nackten Kerne entspreche.

Schliefslich gestatte ich mir die Anzeige zu machen, dafs ich in nächster Zeit über gewisse Regulationsvorgänge bei Kokken Bericht erstatten werde.

# Studien über den Filtrationseffekt der Grundwässer.

Von

Prof. Dr. **Gustav Kabrhel,**

Prag.

## II. Teil.

Im ersten Teile meiner Studien über den Filtrationseffekt der Grundwässer[1]) habe ich dargetan, dafs die auf Grund der Arbeiten von Fraenkel gebildeten und allgemein angenommenen Ansichten über die Mikrobenflora des Bodens dem wirklichen Tatbestande nicht in allen Teilen entsprechen.

Ich konnte nämlich mit Hilfe einer speziell zu diesem Zwecke ausgearbeiteten Methode konstatieren, dafs in einem Terrain, dessen ideale hygienische Reinlichkeit über allen Zweifel erhaben ist, sowohl die über dem Grundwasser in einer Tiefe, in welcher sie nach der herrschenden Meinung steril erscheinen sollten, lagernden, als auch die von dem Grundwasser durchflossenen Bodenschichten eine reichliche Bakterienflora aufwiesen.

Durch weitere Versuche habe ich die interessante, wenn auch paradox erscheinende Tatsache festgestellt, dafs nicht sterile und von einer reichen Bakterienflora bewohnte wasserführende Schichten, unter Benutzung der Fraenkelschen (oder Neißerschen)[2]) Methode der Wasserentnahme, trotzdem steriles Wasser

1) Arch. f. Hygiene, LVIII.

2) An dieser Stelle möchte ich eine im I. Teile dieser Studien (Archiv f. Hyg., 58, S. 359) enthaltene Stelle berichtigen. Wie mich H. Neifser aufmerksam gemacht hat, so wurde die Dampfdesinfektion des Röhrenbrunnens nicht, wie ich daselbst angegeben habe, von C. Fränkel, sondern von Neifser selbst in Vorschlag gebracht.

zu liefern vermögen, ein Umstand, welcher eben als ein Hauptbeweis der Sterilität der wasserführenden Schichten angesehen wurde.

Durch weitere Versuche, welche ergeben haben, dafs aus wasserführenden Schichten, welche eine reiche Bakterienflora beherbergen, in dem Falle, dafs weder die Bohröffnung, noch der in dieselben versenkte Röhrenbrunnen, noch die Schöpfmaschine einer Sterilisation unterworfen werden, ein Wasser erhalten werden kann, dessen Keimgehalt sich in nahe an die Sterilität streifenden Grenzen bewegt, habe ich meine und Fraenkels Versuche trennende Differenzen überbrücken können.

Die zitierten Befunde, welche die Annahme von der Sterilität der wasserführenden Schichten negieren, können freilich nicht ohne Einflufs auf die Theorie der jetzigen Trinkwasserbeurteilung bleiben.

Hat ja doch die Voraussetzung der Sterilität der wasserführenden Schichten einen Hauptpfeiler des Aufbaues derselben gebildet. Von jener Voraussetzung ausgehend, gelangte Hueppe zu dem Schlusse, dafs man, um volle Bürgschaft für die erste und hauptsächlichste Anforderung an die Trinkwässer zu erhalten, am besten tun werde, das zur Wasserversorgung benutzte Trinkwasser den sterilen wasserführenden Schichten zu entnehmen.

Gibt es aber keine sterilen wasserführenden Schichten, so kann offenbar diese Basis nicht mehr zum Ausgangspunkte der Beurteilung genommen werden.

Die Bürgschaft, dafs das Grund- oder Quellwasser vor pathogenen Keimen möglichst gesichert werde, wird man sich wohl auf einem anderen Wege verschaffen müssen.

Soll dies in rationeller Weise geschehen, so kann es in keiner anderen Weise stattfinden, als dafs man den wirklichen Filtrationseffekt als Grundlage benutzt.

Wie ich bereits im ersten Teile[1]) dieser Arbeit des Näheren ausgeführt habe, kann in jedem gegebenen Falle das Zurück-

1) a. a. O.

halten der Mikroben im Boden auf die Wirkung zweier Grundkomponenten, nämlich

a) der vertikalen und b) der horizontalen Filtration zurückgeführt werden.

Wenn also beispielsweise im Punkte *a* der nebenstehenden Abbildung die Bodenschichten mit irgendwelchen pathogenen Mikroben (Typhus, Cholera) etwa aus Düngerhaufen oder ähnlichen unreinen Orten in Berührung kämen, so wird das Auftreten oder Nichtauftreten derselben im Grundwasser einesteils von dem Effekte der vertikalen Filtration durch die die Basis der betreffenden Stelle von dem Grundwasserniveau trennenden Bodenschichten, andernteils von dem Effekte der horizontalen, auf der Strecke zwischen *a* und *b* zur Geltung kommenden Filtration abhängen.

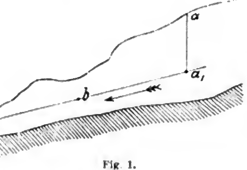


Fig. 1.

Wie ich ferner im ersten Teile der zitierten Arbeit dargelegt habe, kann man den im gegebenen Falle unter Einwirkung bestimmter Bedingungen (welche besonders die Eigenschaften des Bodens und die im gegebenen Moment in Betracht kommende Filtrationsgeschwindigkeit betreffen) in Erscheinung tretenden Filtrationseffekt in ähnlicher Weise wie bei der Sandfiltration durch den Zahlenwert $E:1$ ausdrücken, welcher uns besagt, dafs von der auf der Stelle *a* befindlichen Mikrobenmenge $E$ nur ein einziger bis *b* gelangt. Je gröfser der Wert von $E$ ist, desto vollkommener ist gegebenenfalls auch der Filtrationseffekt, desto geschützter ist die Stelle *b* vor dem Eindringen pathogener Mikroben. Erreicht er einen Wert $E:1 = \infty$, so ist der Schutz der Stelle *b* vor dem Eindringen pathogener Mikroben an der Stelle *a* absolut, d. h. die Bodenschichten besitzen auf den Strecken *a a* und *a b* eine Filtrierfähigkeit, welche, wenn auch auf die Stelle *a* noch soviele pathogene Keime kommen, keinem einzigen von ihnen den Zutritt zur Stelle *b* gewährt.

Die bislang in der Theorie der Trinkwasserbeurteilung geltende Formulierung, welche die Anforderung stellte, dafs das als Trinkwasser zu benutzende Grund- oder Quellwasser sterilen wasserführenden Schichten entstamme, begründete die Prophylaxe auf die Relation $E:1 = \infty$.

Die Sterilität der wasserführenden Schichten, deren Voraussetzung sich bei der praktischen Lösung der Wasserversorgungsfragen Anerkennung verschafft hat, sollte den Beweis bilden, dafs $E:1 = \infty$.

Doch die Voraussetzung der Sterilität der wasserführenden Schichten des Bodens ist, wie ich oben klargestellt habe, nur eine Fiktion.

Obschon es nun also keine sterilen wasserführenden Schichten gibt, so geht daraus noch keineswegs hervor, dafs $E:1$ nicht $\infty$ gleich sein könnte.[1])

Freilich müfste aber der Beweis, dafs die Summe der vertikalen und horizontalen Filtrierkomponenten tatsächlich dem Werte $\infty:1$ gleicht, erst tatsächlich geliefert, nicht jedoch nur vorausgesetzt werden, wie dies bislang auf Grund der unzureichenden Kenntnis der Verbreitung der Mikroben im Boden der Fall war.

Ich habe jedoch bereits in der Einleitung zu diesen Studien[2]) darauf hingewiesen, dafs es weder notwendig noch zweckmäfsig ist, zum Zwecke des Schutzes der Menschen vor Infektionen die Anforderungen bezüglich des Filtrationseffektes der Grund- und Quellwässer so zu stellen, dafs $E:1 = \infty$ ist, sondern dafs man denselben Zweck erreicht, wenn man nur die Anforderung stellt,

1) Zum besseren Verständnis dieser Relation kann auf die ältere Ansicht bezüglich der Sandfiltration hingewiesen werden, nach welcher der Filtrationseffekt für einen absoluten gehalten wurde. Es wurde behauptet, dafs in der Filtrierhaut alle in dem auf das Filter gebrachten Wasser enthaltenen Keime zurückgehalten werden; in den unterhalb des Filtrierhäutchens befindlichen Sandschichten — hat man gemeint — werden die dort reichlich angesiedelten Mikroben hinabgerissen und fortgetragen.

2) a. a. O., S. 357.

dafs der Filtrationseffekt der Grund- und Quellwässer zumindest dem bei einer gut geleiteten Sandfiltration zustande gebrachten wirklichen Effekte gleichkomme.

Würden wir also den letzteren mit $e$ bezeichnen, so wäre in allen Fällen, in welchen man beweisen könnte, dafs $E > e$ um den Schutz des Menschen genügend gesorgt sein.

Es handelt sich nunmehr darum, die Kriterien zu eruieren, vermittelst welcher man den Wert des Filtrationseffektes der Bodenschichten soweit als notwendig bemessen könnte.

Zu diesem Zwecke erscheint es vorteilhaft, vor allem den einfachen Fall einer näheren Betrachtung zu unterziehen, bei welchem man von der Voraussetzung ausginge, dafs bereits in unbedeutender Tiefe unter der Oberfläche die für das Gedeihen der Mikroben nötigen Bedingungen aufhören.

Es ist klar, dafs unter solchen Bedingungen ein Mikrobe nur dann von der Oberfläche in die tieferen Bodenschichten einzudringen vermöchte, wenn er von einem durch den Boden durchsickernden Flüssigkeitsstrom so rasch dahingetragen und so lange nicht zurückgehalten wäre, bevor ihn die supponierten schädlichen Einflüsse vernichtet haben.

Daraus geht hervor, dafs bei Geltung der oben gemachten Voraussetzung das Auftreten eines Mikroben in den tieferen Bodenschichten eigentlich hauptsächlich von mechanischen Faktoren abhängen wird (d. h. von der Filtriergeschwindigkeit und der Zusammensetzung des Bodenfilters).

Des weiteren ergibt sich daraus, dafs bei diesem Sachverhalte der Wert des Filtrationseffektes in einer bestimmten Bodenstrecke mit Hilfe von zweien an je einem Endpunkte derselben angestellten Versuchen bestimmt werden könnte.

Durch Vergleichung der Mikrobenzahl in den Anfangs- und Endpunkten der Filtrationsgrundkomponenten, d. h. der vertikalen und horizontalen Filtration, könnte man zu dem Zahlenwerte des Filtrationseffektes gelangen.

Würden wir die beigefügte Zeichnung benutzen, welche die Filtrationskomponenten darstellt und die Bezeichnungen einführen:

$M$ für die Mikorbenanzahl auf der Stelle $a$
$m$ » » » » » » $a_1$
$\mu$ » » » » » » $b$
$E$ für den Gesamtfiltrationseffekt
$e_1$ » » Filtrationseffekt der vertikalen Komponente
$e_2$ » » » » horizontalen »

so würde sein $e_1 = \frac{M}{m}$

$$e_2 = \frac{m}{\mu}$$

$$\text{und } E = e_1 \, e_2 = \frac{M}{m} \cdot \frac{m}{\mu}.$$

Die Voraussetzung, dafs das Auftreten der Mikroben wesentlich von mechanischen Faktoren (der Art des durch die Bodenschichten sickernden Flüssigkeitsstroms und der Struktur des Bodenfilters) abhängt, ist jedoch, wie ich zeigen werde, nicht richtig, so dafs sich in der Gleichung $E = \frac{M}{m} \cdot \frac{m}{\mu}$ gewisse Änderungen als nötig ergeben werden.

Um sie zu vollführen, müssen wir vor allem die Erscheinungen diskutieren, welche zum Beweise der Unzulänglichkeit der mechanischen Erklärung der fraglichen Beziehungen angeführt werden können.

Diesbezüglich sind vor allem die im ersten Teile dieser Studie dargelegten Befunde anzuführen, nach welchen einesteils die Mikrobenmenge mit dem Eindringen in die Tiefe sprungweise Schwankungen aufweist, andernteils aber in derselben Tiefe sehr verschieden ist.

Zur leichteren Orientierung füge ich hier die Resultate eines solchen Versuches bei:

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|
| 11. Juni 1902 | Oberfläche | 651 720 | 65 172 |
| | 0,3 m | 243 040 | 24 304 |
| | 1,2 » | 10 360 | 1 036 |
| | 1,4 » | 380 | 38 |
| | 1,8 » | 1 180 | 118 |
| | 3,5 » | 281 680 | 28 168 |
| | 3,5 » | 2 100 | 210 |
| | 4,0 » | 30 520 | 3 052 |
| | 4,0 » | 9 220 | 922 |
| | 4,1 » | 720 | 72 |
| | 5,1 » | 3 200 | 329 |

Desgleichen können durch die mechanische Erklärung diejenigen Befunde nicht in Übereinstimmung gebracht werden aus welchen hervorgeht, dafs von einer gewissen Tiefe angefangen, die Mikrobenzahl nicht mehr abnimmt, wie der nachstehende Versuch zeigt.

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|
| 8. April 1902 | Oberfläche | 564 480 | 56 448 |
| | 0,5 m | 8 200 | 820 |
| | 1,0 » | a) 300 | a) 30 |
| | | b) 140 | b) 14 |
| | 2,0 » | a) 40 | a) 4 |
| | | b) 80 | b) 8 |
| | 3,0 » | 100 | 10 |
| | 4,3 » | a) 100 | a) 10 |
| | (aus dem Bereiche des Grundwassers) | b) 80 | b) 8 |

Die mechanische Erklärung des Eindringens der Mikroben in die tieferen Bodenschichten führt unausweichlich zu der Konsequenz, dafs die tieferen Schichten an einem Orte mit bestimmter physikalischer Struktur und bestimmten Eigenschaften der Flüssigkeitsbewegung mikrobenärmer sein müssen, ein Umstand, der

jedoch, wie die angeführten Versuche lehren, in Wirklichkeit nicht zutrifft.

Da die mechanische Erklärung nicht genügt, erscheint es daher notwendig, eine andere Erklärung hierfür zu suchen. Dieselbe ergibt sich, wenn man die biologischen Faktoren in Rechnung zieht.

Die Grundlage dazu bildet der im ersten Teile dieser Studie gelieferte Beweis, dafs auch die tieferen Schichten des Bodens zahlreichen Mikrobenarten die für sie notwendigen Ernährungs- und Vermehrungsbedingungen bieten.

Es leuchtet ein, dafs man auf dieser Grundlage ungezwungen sowohl die jähen Sprünge der Mikrobenzahl in den die Baumwurzeln umgebenden Bodeninseln, als auch die Tatsache, dafs die Mikrobenverbreitung von der Tiefe von 2 m an in zahlreichen Fällen in den tiefergelegenen Schichten keine weiteren wesentlichen Veränderungen bietet.

Tritt nun der Fall ein, dafs auf irgendwelche Weise in die tieferen Bodenschichten ein zu jener Mikrobenart gehöriges Individuum eindringt, welches die Fähigkeit besitzt, sich unter den in den tieferen Bodenschichten gegebenen Bedingungen zu vermehren, so kann sich natürlich dasselbe auch ziemlich stark verbreiten.

Das gegenseitige Verhältnis der mechanischen und biologischen Faktoren könnte etwa in der nachfolgenden Weise präzisiert werden:

Den mechanischen Faktoren, welche das Hinabgelangen eines bestimmten Mikroben durch den (vertikalen oder horizontalen Wasserstrom auf einen bestimmten Ort innerhalb der Bodenschichten bewirken, kommt die Bedeutung der ursprünglichen primären Wirkung zu, an welche sich weiterhin die sekundäre Wirkung der biologischen Faktoren anschliefst, deren Charakter es bestimmt, ob jener Mikrobe zur weiteren Verbreitung gelangt oder nicht.

Berücksichtigen wir nun die Wirkungen der biologischen Faktoren, so gilt die oben zitierte Gleichung nicht mehr in der Form

$$E = e_1 \, e_2 = \frac{M}{m} \cdot \frac{m}{\mu},$$

in welcher $e_1 = \frac{M}{m}$ und $e_2 = \frac{m}{\mu}$ die Grundkomponenten der Filtration bezeichnen, sondern in der Form

$$E > \frac{M}{m} \cdot \frac{m}{\mu}, \text{ weil}$$

$$e_1 > \frac{M}{m} \text{ und } e_2 > \frac{m}{\mu},$$ d. h. wenn wir durch einen bakteriologischen Versuch, die Mikrobenzahl des Bodens mit $M$, $m$ und $u$ feststellen, so ist der durch den Bruch $\frac{M}{m}$ repräsentierte Wert kleiner als der Filtrationseffekt der vertikalen Komponente und die durch den Bruch $\frac{m}{\mu}$ erhaltene Zahl ist kleiner als der Filtrationseffekt der horizontalen Komponente.

Nachdem wir uns die vorzitierten Relationen entwickelt haben, können wir nunmehr an die Lösung eines Spezialfalles schreiten.

Zu diesem Zwecke wenden wir unsere Aufmerksamkeit zunächst denjenigen Beobachtungen zu, welche sich auf die vertikale Komponente beziehen und zwar unter Bedingungen, in welchen die Filtriergeschwindigkeit ausschliefslich als das Resultat der Regenniederschläge erscheint, wie dies z. B. in Feldern, Wäldern u. a. der Fall ist. Unter solchen Bedingungen ist, wie im ersten Teile dieser Studie dargelegt wurde, die Filtriergeschwindigkeit sehr klein und beträgt bei mittleren Niederschlägen und mittlerer Durchlässigkeit des Bodens nicht mehr als 1,3—2,0 m pro Jahr.

In Anbetracht dieses Charakters der Filtriergeschwindigkeit habe ich einen bakteriologischen Bodenversuch in einem sandigen Terrain (Diluvialsand) von grofser Durchlässigkeit, an einer völlig vegetationslosen Stelle (am Hofe eines Bauerngehöftes) angestellt.

Die Gründe, welche die Wahl einer vegetationslosen Stelle bestimmt haben, sind die folgenden gewesen. Wie ich oben dargetan habe, erschwert die Wirksamkeit der biologischen Faktoren die Erkenntnis des Filtrationseffektes. Eben mit Rück-

sicht auf die biologischen Faktoren mufste in den oben entwickelten Relationen das Zeichen »=« gegen das Zeichen »>« ausgetauscht werden. Es ist also klar, dafs wir uns dem Wert des Filtrationseffektes um so mehr nähern werden, je besser uns die Ausscheidung irgendeines Teiles der biologischen Faktoren gelingen wird. Da jedoch die Pflanzenwurzeln einen jener die Verbreitung der Mikroben im Boden unterstützenden biologischen Faktoren bilden, so erschien es auch zweckmäfsig, zu dem Versuche eine völlig vegetationsfreie Stelle zu wählen.

Das Resultat jenes Versuches ist in der nachstehenden Tabelle verzeichnet:

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|
| 24. Mai 1906 | Oberfläche | 3 470 760 | 347 076 |
| | 0,5 m | 22 680 | 2 268 |
| | 1,5 » | 240 | 24 |

Legen wir die durch diesen Versuch gewonnenen Zahlen der Berechnung des Filtriereffektes zugrunde, so ist

der Filtrationseffekt in 1,5 m Tiefe $> \frac{347\,076}{24} = 14\,161:1$,

d. h. von 347076 Mikroben, welche den Grad der Verunreinigung der Bodenoberfläche des Bodens bezeichnen, kann in die Tiefe von 1,5 m nur eine Zahl gelangen, die kleiner ist als 24 oder von 14461 weniger als 1.

Bei Voraussetzung derselben Bodenzusammensetzung erschien der Filtrationseffekt in 3 m Tiefe gröfser als 14461 $\times$ 14461:1, d. h. 209120521 : 1.

Aus dem Angeführten ergibt sich, dafs bereits die in solcher Weise vorgenommene Berechnung, welche nicht den wirklichen Wert des Filtrationseffektes, sondern nur die minimale Grenze, unter die derselbe nicht herabsinken kann, angibt, zu dem Schlusse führt, dafs der Filtrationseffekt bereits in 3 m Tiefe in einem stark durchlässigen Terrain unter den in der Natur herrschenden Verhältnissen, in welchen die vertikale Filtriergeschwindigkeit

nur durch die Regenniederschläge reguliert wird, absolut sein mufs, d. h. dafs von der Oberfläche nahezu kein einziger Mikrobe in die Tiefe von 3 m eindringt.

Um wieviel der Filtrationseffekt in 1,5 m Tiefe unter den in dem oben angeführten Versuche gegebenen Bedingungen den Wert 14461 : 1 übersteigt und ob er etwa daselbst nicht schon die absolute Höhe ∞ : 1 erreicht, kann freilich in der angedeuteten Weise nicht ermittelt werden. Nichtsdestoweniger ergibt sich bereits aus dem Angeführten, dafs der Filtrationseffekt in 1,5 m Tiefe unter den Bedingungen des zugrunde gelegten Versuches weit gröfser sein mufs als der bei gut geleiteter Sandfiltration erzielte Filtrationseffekt.

Denn im Sinne der vom Verfasser im Jahre 1892[1]) über die Wirksamkeit der Sandfilter ausgeführten Versuche mufs der wirkliche Filtrationseffekt der Sandfilter im Stadium ihrer vollkommenen Wirksamkeit mit 7000 : 1 bewertet werden.

Bereits aus den eben zitierten Beobachtungen geht hervor, dafs der von einer 1,5 m dicken Bodendecke unter den natürlichen, nur von den Regenniederschlägen beeinflufsten Geschwindigkeitsverhältnissen der Filtration gebotene Schutz bereits einen hohen Grad erlangt, so dafs man schliefsen kann, dafs der in dieser Tiefe zur Geltung kommende Filtrationseffekt gröfser ist, als selbst bei einer gut geleiteten Sandfiltration der Fall ist, deren Leistungsfähigkeit, wie die Altonaer Erfahrungen zeigen, Bürgschaft für den Schutz gegen die durch das Wasser auf den Menschen übertragbaren Krankheiten leistet.

Es können jedoch Belege herbeibracht werden, welche bezeugen, dafs in sandigem, also sehr durchlässigem Terrain unter

1) Experim. Studien über die Sandfiltration (Arch. f. Hyg., XXII). Mit Hinblick auf die neuerdings von Hilgermann (dies. Archiv, LIX) publizierte Arbeit hält es der Verf. für zweckmäfsig, zu bemerken, dafs in den Versuchen, auf welchen die Bestimmung des wirklichen Filtrationseffektes mit dem zitierten Werte beruht, Bac. prodigiosus keine Verwendung gefunden hat. Da sonst die Methode präzis war, so glaubt der Verf. dafür halten zu können, dafs die obzitierte Zahl tatsächlich dem approximativ richtigen Filtrationseffekt im Stadium der vollkommenen Wirksamkeit der Sandfilter entspreche.

natürlichen Geschwindigkeitsverhältnissen der Filtration die Bodenschichten bereits in 1,0—2,0 m Tiefe vor der Invasion jener Mikroben, welche durch den Einflufs der verschiedensten Faktoren in die oberflächlichen Bodenschichten gelangen und daselbst haften bleiben, geschützt sein können, so dafs in einem solchen Falle der Filtrationseffekt bereits in dieser Tiefe mit aller Wahrscheinlichkeit, also absolut, d. h. $\infty : 1$ angesehen werden kann.

Dies bezeugen einzelne jener Versuche, welche von dem Verfasser in feldigem zu Agrikulturzwecken dienendem Terrain unternommen werden; diese Feldflächen werden in regelmäfsigen Intervallen gedüngt, geackert, geeggt und besäet, wobei reichlich Gelegenheit geboten wird, dafs die oberflächlichen Bodenschichten teils mit neu hinzugelangenden Mikroben, teils mit organischen Nährstoffen bereichert werden.

Die nachstehenden zwei Versuche fallen besonders in die Wagschale:

**Versuch Nr. 7.**

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|---|
| | aufserhalb des Grundwassers | im Bereiche des Grundwassers | | |
| 8. April 1902 | Oberfläche | | 564 480 | 56 448 |
| | 0,5 m | | 8 200 | 820 |
| | 1,0 » | | a) 300 | 30 |
| | | | b) 140 | 14 |
| | 2,0 » | | a) 40 | 4 |
| | | | b) 80 | 8 |
| | 3,0 » | | 100 | 10 |
| | | 4,3 m | a) 100 | 10 |
| | | | b) 80 | 8 |

**Versuch Nr. 10.**

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|---|
| 14. Sept. 1902 | Oberfläche | | 760 000 | 76 000 |
| | 0,5 m | | 22 120 | 2 212 |
| | 1,0 » | | a) 80 | 8 |
| | | | b) 120 | 12 |
| | 1,65 » | | a) 120 | 12 |
| | | | b) 140 | 14 |
| | | 2,20 m | 200 | 20 |

Betrachtet man das Verhalten der Mikroben im Versuch Nr. 7, so bemerkt man, dafs die Abnahme der Mikrobenzahl bis in 2 m Tiefe reicht und weiterhin sich nicht mehr ändert. Im Versuche Nr. 9 hört die Abnahme bereits in der Tiefe von 1 m auf; in tieferen Lagen ist keine wesentliche Änderung mehr festzustellen.

Es liegt somit der Schlufs nahe, dafs unter den hier gegebenen Boden- und Filtriergeschwindigkeitsverhältnissen in der Tiefe von 1—2 m an die Verbreitung der Mikroben von den Mikroben der Oberfläche unabhängig ist, woraus wieder geschlossen werden kann, dafs eine 1—2 m dicke Schicht unter den angegebenen Verhältnissen imstande war, den darunter liegenden Bodenschichten einen sicheren Schutz zu bieten. Auch der Umstand, dafs in den betreffenden Bodenschichten hauptsächlich der B. terrestris alb. vertreten war, spricht für die oben angeführte Schlufsfolgerung.

Der Grund eines solch vollkommenen Schutzes, den je nach den Umständen durchlässige Schichten in 1—2 m Tiefe bieten können, ist teils in mechanischen, teils in biologischen Momenten zu suchen. In ersterer Beziehung fällt besonders das diskontinuierliche Vordringen der Regenniederschläge in die Tiefe, dessen Richtung sich je nach den Umständen ändern kann, und die aufserordentlich geringe Filtriergeschwindigkeit in die Wagschale[1]. In biologischer Hinsicht spielt die Besetzung der Oberflächenschichten durch die daselbst dauernd angesiedelten Mikroben, mit welchen die neu hinzugelangenden Mikroben um ihre Existenz kämpfen müssen, sodann die Eigenschaften des Bodens, die Wärme und die Bodenluft eine grofse Rolle.

Es wird vielleicht zweckmäfsig sein, wenn ich noch bemerke, dafs an Orten, an welchen es sich um ein kontinuierliches Eindringen von Flüssigkeiten in durchlässige Sandschichten handeln würde, ganz andere Verhältnisse auftreten, unter welchen den in jenen Flüssigkeiten enthaltenen Mikroben der Weg in die tieferen Bodenschichten geöffnet wird.

Derartige Verhältnisse treffen wir insbesondere bei dem Durchsickern des Inhaltes undichter Kanäle, Latrinen etc.

1) Siehe den ersten Teil dieser Studie.

Bei tonigen Böden, in welchen die Beimengung von Tonbestandteilen eine gröfsere Dichtigkeit und Undurchlässigkeit, d. h. eine gröfsere Filtrationskraft bedingt, kann bereits a priori geschlossen werden, dafs der Schutz der tieferen Schichten gegenüber den Mikroben der Oberfläche noch wirksamer sein wird, als es in rein sandigem Boden der Fall ist.

Als experimenteller Beweis sei der Befund an den die Basis eines Düngerhaufens am Hofe eines Bauerngehöftes bildenden Schichten mitgeteilt.

Um die Zeit des Versuches (Ende Mai) war der Düngerhaufen hoch mit Dünger gefüllt. Es mufste derselbe also, um die nötige Fläche zu gewinnen, abgetragen werden, worauf erst an die Herstellung der zur Entnahme der Proben notwendigen Grube geschritten werden konnte.

Die auf der Stelle der Grube befindlichen Bodenschichten besafsen nachstehende Eigenschaften.

Die Basis des Düngerhaufens wurde von einer einige Zentimeter dicken Schicht fetten Tones gebildet, welcher sich beim Kneten als plastisch, also lettenhaltig erwies. Sie zeigte intensiven Mistjauchengeruch. Unter dieser dünnen Dicke fetten Tones befand sich von tonigen Bestandteilen freier Diluvialsand, was die unangenehme Folge hatte, dafs die Grubenwände einige Male abgerutscht sind.

Das Resultat dieses Versuches war aufserordentlich überraschend, nahezu unerwartet. Die betreffenden bakteriologischen Daten findet man in der folgenden Tabelle:

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|
| 24. Mai 1902 | Aus der lettigen Oberflächenschichte | Unzählbar (die Platten waren vorzeitig verflüssigt, so dafs die Kolonien nicht abgezählt werden konnten. | |
| | 0,5 m | 21 840 | 2 184 |
| | 1,0 » | 400 | 40 |
| | 1,5 » | 360 | 36 |

Dieser Versuch zeigt somit, dafs an dieser Stelle, die seit Jahren zur Ablagerung des Düngers benutzt worden war, deren Basis von einer lettenartigen, blofs einige Zentimeter dicken Schicht gebildet war, in der Tiefe von 1,0 und 1,5 m eine bereits verhältnismäfsig geringe Mikrobenzahl vorhanden war.

Es kann somit geschlossen werden, dafs tonige (lettige) Schichten eine so grofse Schutzkraft besitzen, dafs sich selbst unter einer so unreinen Stelle, wie es ein Düngerhaufen ist, dessen Basis von Jauche bespült wurde, in geringer Tiefe Schichten befinden, welche keine Spur jener Verunreinigung mehr zu erkennen geben.

Ich schreite nun zur Behandlung des Filtrationseffektes der horizontalen Komponente.

Um diese Frage näher zu beleuchten, wurde ein Versuch entnommen, dessen Stelle in einem Abstande von 50 m von dem nächsten Hause des Dorfes L., welches in dem das dieser Studie als Operationsfeld dienenden Versuchsterrain lag. Diese Stelle wurde der Art gewählt, dafs sie in der Richtung des Verlaufes des von der Ortschaft L. zur Versuchsstelle fliefsenden Grundwassers lag. Die Bewegungsgeschwindigkeit der letzteren war im Durchschnitte in diesem Versuchsterrain 1,13 m pro Tag.[1]) Der Boden, auf dem die Ortschaft L. liegt, ist rein sandig, durchlässig, frei von Tonbestandteilen. Es handelt sich abermals um Sandanschwemmungen diluvialen Ursprunges. Das Niveau des Grundwassers ist im Bereiche des genannten Dorfes verhältnismäfsig wenig von der Oberfläche entfernt, im Durchschnitte kaum 2 m, stellenweise selbst weniger als 1 m.

Unter solchen Verhältnissen konnte bereits a priori erwartet werden, dafs der flüssige Inhalt der unreinen Stellen, als Düngerhaufen, Aborte und Ställe, in das Grundwasser durchsickern mufs. Die in dieser Beziehung ausgeführten Untersuchungen ergaben auch einen direkten Beweis für diese Vermutung.

1) Auf Grund der von Baurat Ing. Thiem, Leipzig, ausgeführten hydrologischen Untersuchungen.

So fand sich z. B. in einem Bauernhofe ein Brunnen vor, welcher nach den Angaben der Bewohner nur zur Tränke des Hausviehes diente. Derselbe war, jedenfalls um das Wasser nicht von weit her holen zu müssen, in der Nähe des Stalles angelegt worden und befand sich zugleich in der Nähe von Orten, aus welchen der flüssige Inhalt in die Bodenschichten eindrang. Das Wasser dieses Brunnens wies bereits bei bloſser Besichtigung untrügliche Spuren der verhängnisvollen Nachbarschaft auf. Die Anwohner des Gehöftes waren sich dieses Umstandes bewuſst und benutzten für den eigenen Gebrauch einen anderen bedeutend entfernten und in dem anliegenden Garten errichteten Brunnen.

Das Resultat der an der 50 m von der Ortschaft entfernten Stelle angestellten Versuche ist in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt:

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe | | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|---|
| | auſserhalb des Grundwassers | im Bereiche des Grundwassers | | |
| | Oberfläche | | 1 215 200 | 121 520 |
| | 0,5 m | | 68 240 | 6 824 |
| | 1,4 » | | 180 | 18 |
| | | 2,46 m | a) 60 | 6 |
| | | | b) 40 | 4 |

Soll die Bedeutung dieses Versuchsresultates im richtigen Lichte erscheinen, muſs dasselbe mit Resultaten von anderen Nachbarstellen desselben Versuchsterrains verglichen werden, welche bei sonst gleicher Zusammensetzung der Bodenschichten von den Ortschaften, welche es überhaupt beeinflussen könnten, mehrere Kilometer weit entfernt waren.

Die diesbezüglichen Ergebnisse bringt die folgende Tabelle:

| Datum | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe: außerhalb des Grundwassers | Tiefe der Entnahme der Bodenprobe: im Bereiche des Grundwassers | Keimzahl in 1 ccm | Keimzahl in 0,1 ccm |
|---|---|---|---|---|
| 8. April 1902 Im Feld | Oberfläche | | 564 480 | 56 448 |
| | 0,5 m | | 8 200 | 820 |
| | 1,0 » | | a) 320 | 32 |
| | | | b) 140 | 14 |
| | 2,0 » | | a) 40 | 4 |
| | | | b) 80 | 8 |
| | 3,0 » | | 100 | 10 |
| | | 4,3 m | a) 100 | 10 |
| | | | b) 80 | 8 |
| 14. April 1902 | Oberfläche | | 760 000 | 76 000 |
| | 0,5 m | | 22 120 | 2 212 |
| | 1,0 » | | a) 80 | 8 |
| | | | b) 120 | 12 |
| | 1,65 » | | a) 120 | 12 |
| | | | b) 140 | 14 |
| | | 2,2 m | 200 | 20 |
| 19. April 1902 Im Walde, die nächste Ortschaft, die einen Einfluſs hätte ausüben können, ist etwa 4 km entfernt. | Oberfläche | | 807 520 | 80 752 |
| | 1,0 m | | 5 040 | 504 |
| | 1,5 » | | 1 120 | 112 |
| | | 3,1 m | a) 260 | 26 |
| | | | b) 300 | 40 |

Vergleicht man nun die Mikrobenzahl der wasserführenden Schichte an der von L. 50 m entfernten Stelle mit derjenigen an anderen Orten, bei welchen abnormale verunreinigende Einflüsse, besonders von Ortschaften, auf Grund der groſsen Entfernung nicht in Betracht kommen, so gelangt man zu der Schluſsfolgerung, daſs sich die erstere Stelle, obwohl der Grundwasserstrom von der Ortschaft L. zu derselben verläuft, bereits auſserhalb des Bereiches der verunreinigenden Einflüsse, welche in der Ortschaft L. selbst zur Geltung kommen, befindet.

Zu derselben Schlufsfolgerung führt auch die Betrachtung der Bakterienflora der wasserführenden Schichte, welche am Orte des oben angeführten Versuches gerade so wie an anderen Stellen des betreffenden Geländes durch das Vorkommen des Bac. terrestris alb. gekennzeichnet war.

Hieraus ergibt sich, dafs unter den gegebenen Verhältnissen die Strecke von 50 m schon hingereicht hat, um in bakteriologischem Sinne jene schädlichen Einflüsse, welchen das durch den Bereich der Ortschaft L. fliefsende Grundwasser ausgesetzt ist, wettzumachen.

In dem nächstfolgenden Teile beabsichtige ich, auf Grundlage des Filtrationseffektes einige Fragen zur Diskussion zu bringen, deren allgemeine Analyse für die praktische Durchführung von Wasserversorgungsanlagen von prinzipieller Wichtigkeit ist.

# Theorie der Serumaktivität.

Von

Prof. Dr. **Oskar Bail** und Privatdozent Dr. **Edmund Hoke**
Assistenten des Institutes. Assistenten der internen Klinik von Jaksch.

(Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag. Vorstand: Prof. F. Hueppe.)

## Einleitung.

Die Versuche, welche zum Studium der Serumaktivität angestellt wurden, umfassen, allerdings mit mehrfachen, kurzen Unterbrechungen, einen Zeitraum von über zwei Jahren. Ihr Zweck war, über das Wesen der Serumwirkung auf Bakterien zu bestimmten, einfachen Vorstellungen zu gelangen und diese dann für ein programmäfsiges Studium des Infektionsproblems zu verwerten.

Bekanntlich — es ist nicht nötig, die jedermann vertraute Literatur im Detail zu besprechen — unterliegt die Wertschätzung der Säftewirkung des Körpers für die Infektion einer sehr verschiedenen Beurteilung. Während die einen, Metschnikoff an der Spitze, die Bedeutung der Säfte gegenüber der der Zellen recht gering veranschlagen, vertritt vor allem Pfeiffer den Standpunkt, dafs durch die Aktivität der Körperflüssigkeiten der Verlauf und der Ausgang oder das Versagen der Infektion allein erklärt werden könne, während die Zelltätigkeit dagegen sehr in den Hintergrund trete. Bis in die neuere Zeit haben sich namentlich, in Deutschland, viele Forscher

der Ansicht Pfeiffers angeschlossen, namentlich seit durch Ehrlichs grofsartige theoretische Untersuchungen ein förmliches, wenn auch oft kompliziertes System der Serumwirkungen geschaffen war. Es finden sich aber sowohl bei Ehrlich, als bei einem der hervorragendsten und erfolgreichsten Vertreter seiner Lehre, bei A. Wassermann, genug Anhaltspunkte dafür, dafs diese Forscher bei starker Betonung der Säftewirkung doch auch die Besonderheit der Leukozyten für die Infektion nicht vernachlässigen wollen, mindestens, soweit ein genetischer Zusammenhang zwischen Blut und Zellen in Betracht kommt.

Es mufs den Verfassern gestattet sein, den Standpunkt, den sie selbst in dieser wichtigen Frage einnehmen und der die mitzuteilenden Untersuchungen geleitet hat, zu charakterisieren. Er besteht in der unbedingten Ablehnung der Lehre Pfeiffers, dafs man durch die blofse Wirkung der Körperflüssigkeiten den Verlauf einer Infektion erklären und weiterhin das Wesen der Immunität verständlich machen könne. Von den drei Wirkungen, welche das normale oder durch Immuinsation veränderte Blut auf Bakterien und Bakteriensubstanz auszuüben vermag, der agglutinierenden, bakteriziden und präzipitierenden, hat nur die mittlere für Infektion und Infektionsabwehr eine unmittelbar verständliche Bedeutung und ist auch mit Sicherheit allein im Tierkörper unter besonderen Bedingungen zu beobachten. Tatsächlich wird auch nur die Bakterizidie oder Bakteriolyse der Körpersäfte als für das Tier bedeutungsvoll angenommen, während über den Wert der doch mindestens ebenso auffälligen Agglutination und Präzipitation niemand etwas zu sagen weifs, so vielfach auch diese Phänomene diagnostisch benutzt worden sind; ja beide erscheinen sogar auf den ersten Blick als zweckwidrig: die Präzipitation schon an sich, mindestens sobald sie im Gefäfssystem sowie im Reagenzglase stattfinden würde, die Agglutination für die nachfolgende Bakteriolyse, welche nach den bekannten Watteversuchen Buchners nur dann ordentlich stattfindet. wenn Bakterien einzeln dem Serum zugänglich sind. Sieht man aber so imponierende Reagenzglasphänomene im lebenden Tiere ausbleiben, so frägt man von vornherein, ob denn nicht

auch die Bakteriolyse im Tiere ein anderes Aussehen als im Glase annehmen könne. Der typische Pfeiffersche Versuch zeigt nun freilich den Verlauf der Bakterienvernichtung sinnfällig genug, und es ist nicht zu zweifeln, dafs das Ausbleiben der intraperitonealen Cholerainfektion von Meerschweinchen auf die Keimvernichtung durch die Körpersäfte, mindestens beim Immunitätsversuche zurückgeführt werden mufs. Aber es läfst sich leicht zeigen, dafs eine Bakteriolyse solcher Art nur in den Körperhöhlen und vielleicht innerhalb der grofsen Gefäfse, sonst aber nirgends im Körper möglich ist und auch da in vollendeter Weise nur bei wenigen Bakterien, insbesondere den Vibrionen.[1]) Schon der Typhusbazillus verhält sich etwas anders; denn selbst in der Meerschweinchenbauchhöhle erfolgt seine »Auflösung« oft so verzögert, dafs man sich nur sehr schwer entschliefsen kann, das schliefsliche Überleben der Versuchstiere nur auf normale oder gesteigerte Bakteriolyse zu beziehen. Nicht minder wichtig ist die Feststellung Metschnikoffs, dafs Meerschweinchen, und zwar durch Leukozytenwirkung Cholerainfektion überstehen können, obwohl keine sichtbare Bakteriolyse eintritt. Dieser Metschnikoffsche Versuch, dessen Ausführung bei richtiger Technik in allen möglichen Variationen gelingt, hat neuerlich durch Weil und Axamit[2]) eine sehr wesentliche Erweiterung gefunden. Trotz Einspritzung hochwertigen Immunserums konnten Weil und Axamit unter Verwendung der gegenwärtig vielstudierten sog. komplementbindenden Systeme jede Möglichkeit der Säftebakterizidie ausschliefsen und dennoch die Tiere am Leben erhalten, wenn sie nur für die Anwesenheit von Leukozyten in der Bauchhöhle sorgten. Daraus folgt sofort, dafs neben der Bakteriolyse noch ein anderes Moment die Abwehr der Infektion vermitteln kann, und dafs dieses Moment, welches unzweifelhaft mit den Leukozyten des Tieres in enger Beziehung steht, die übergeordnete Bedeutung hat. Der umgekehrte Beweis dafür, dafs die Bakteriolyse allein nicht die Krankheit unmöglich macht, ist ebenfalls geführt worden, indem durch

1) Vielleicht auch nur beim Meerschweinchen.

2) Berliner klinische Wochenschrift 1906, Nr. 52.

Vergiftung oder Anwendung von Choleraaggressin Leukozyten ferngehalten wurden, während die Bakteriolyse zwar ablief, aber den Tod der Tiere nicht verhinderte.

Das alles sind Tatsachen, welche gegen die ausschlaggebende Bedeutung der Säftebakterizidie auf deren klassischem Gebiete, dem der Choleraimmunität, sprechen. Auf andere Bedenken stöfst man augenblicklich, sobald man mit Bakteriolyse andere Immunitätserscheinungen erklären will. Für den Typhus z. B. kommt, aufser der oben bereits erwähnten Langsamkeit seiner Auflösung noch in Betracht, dafs er im Tierkörper sehr schnell eine hochgradige Widerstandskraft gegen jede Serumaktivität erlangt, so dafs schliefslich die beste Säftebakterizidie nichts mehr nutzen kann. Eine ganze Anzahl von Immunitäten, aktive wie passive, sind bekannt, bei denen von Bakteriolyse weder im Tiere noch im Reagenzglase etwas zu sehen ist, so die Immunität gegen Pest, Milzbrand, Hühnercholera, Schweinerotlauf. Tritt aber einmal bei hochgradiger Vorbehandlung von Tieren eine gewisse Bakteriolyse im Serum auf, so läfst sich leicht zeigen, dafs diese die Immunität unmöglich bedingen kann, wie Weil[1]) bei Hühnercholera bewiesen hat. Der neue Ausdruck: antiinfektiöse Immunität, den man für diese Formen aufgebracht hat, und bei dem man sich nach Belieben viel oder wenig denken kann, kennzeichnet die Verlegenheit, sie in einem Immunitätsschema unterzubringen, das nur für antitoxische und bakteriolytische Immunität Platz hat.

Am deutlichsten zeigt sich das Unvermögen der Humoralaktivität, für das Infektionsproblem etwas zu leisten bei der natürlichen Immunität gegen die verschiedensten Bakterien. Es wäre eine leichte Aufgabe, Bakterien aufzuzählen, die jeder bakteriolytischen Serumwirkung eines Tieres, z. B. des Meerschweinchens, unzugänglich sind, und die gar nicht infizieren oder nur mittels eingreifender künstlicher Mittel zum Wachstum gebracht werden können. Ebenso sind genug Fälle bekannt, wo bei hochgradiger Serumbakteriolyse im Reagenzglase die

1) Dieses Archiv Bd. 61, S. 293.

gröfste Empfindlichkeit gegen Infektion besteht. Auch eine Zerlegung der ursprünglich als einheitlich angenommenen Alexine des Blutes in die Komponenten, Immunkörper und Komplement hat wenig genutzt, denn auch das Vorhandensein von isolierten Immunkörpern steht z. B. bei Milzbrand oder Proteus[1]) in keinem Zusammenhange mit Widerstandskraft oder Empfänglichkeit der betreffenden Tierart.

Nun hat man zwar durch neuere Versuche mit komplementbindenden Systemen verschiedene Mikroorganismen zum Wachstum im Tierkörper und damit zu einer Infektion bringen können, und da auf diese Weise erfahrungsgemäfs auch die Blutbakterizidie unwirksam gemacht wird, so liegt der Schlufs nahe, dafs dieses Moment gleichzeitig das infektionsbegünstigende sei. Im hiesigen Institut sind ziemlich ausgedehnte Versuche über diesen Gegenstand angestellt worden, welche diese Annahme aber als sehr zweifelhaft erscheinen lassen. Zunächst wirken die verschiedenen, für diesen Zweck angewendeten komplementbindenden Systeme auch infektionsbegünstigend auf Mikroorganismen, denen gegenüber eine Säftebakteriolyse der Versuchstiere (meist Meerschweinchen) gar nicht besteht, wie dies bei Hühnercholera, Heubazillus und auch Milzbrand der Fall ist. Wichtiger ist noch die Erscheinung, dafs die Infektionsbeförderung durchaus nicht bei allen Bakterien gelingen will; hierher gehört namentlich der Schweinerotlauf und der Pseudodiphtheriebazillus, bei welchen auch Injektion kolossaler Bakterienmengen (Satz von 30 ccm einer hochvirulenten Taubenkultur des Rotlaufbazillus) die natürliche Immunität der Meerschweinchen nicht zu brechen vermag. Einiges Licht auf das Wesen der Infektionsermöglichung werfen Versuche von Weil[2]) mit Bacillus subtilis. »Komplementbindende« Stoffe von schwacher Wirkung (z. B. Präzipitate, die aber die Cholerainfektion schon sehr wesentlich erleichtern) leisteten nichts, bessere Resultate ergab die Kombination von Menschenserum und dem zugehörigen Präcipiten, die weitaus besten aber eine Mischung von Choleravibrionen-

1) Pettersson, Zentralblatt für Bakteriologie. Bd. 39, Nr. 4.

2) Zentralblatt für Bakteriologie. Bd. 44, Nr. 2.

extrakt und Choleraimmunserum. Diese Reihenfolge ist dieselbe, in welcher auch eine andere Eigentümlichkeit der »komplementbindenden Systeme« hervortritt, nämlich Verzögerung des Leukozytenzutrittes und im Zusammenhange damit ausgesprochene Vergiftung; überdies haben sie wahrscheinlich einen eigentümlichen Einflufs auf den Zustand der Bazillen selbst. Es ist hier nicht der Ort, diese interessanten Ergebnisse näher zu besprechen, aber das eine geht aus ihnen hervor, dafs die etwaige Ausschaltung bakterizider Kräfte, welche solche Mittel bewirken, den allergeringsten Wert für die Infektionsbeförderung hat.

Alle angeführten Gründe rechtfertigen die Ablehnung der von Pfeiffer vertretenen Lehre, dafs die Säftebakteriolyse, von besonderen Fällen abgesehen, einen ausschlaggebenden Einflufs auf das Zustandekommen und den Verlauf einer Infektion habe, geschweige denn, dafs sie die natürliche oder künstliche Immunität erklären könne.

Trotzdem wäre es aber durchaus verkehrt, den Körpersäften jede Bedeutung absprechen zu wollen. Für jede Infektion kann man sich den infizierten Makroorganismus zusammengesetzt denken aus Säften und Zellen, welch letztere wieder in zwei Gruppen zerfallen. In die erste gehören jene hoch, aber einseitig ausgebildeten Zellen, welche dementsprechend auf Reize wesentlich nur mit einer Steigerung ihrer spezifischen Funktion antworten können, wie Nerven oder Muskeln, und welche daher für den Infektionsverlauf mehr passiv als aktiv in Betracht kommen. Ihnen gegenüber stehen als Hauptvertreter der zweiten Zellgruppe die Leukozyten, welche sich in vieler Hinsicht eine gewisse Selbständigkeit bewahrt haben, und von denen man daher eine besondere Leistung auf den besonderen Reiz der Infektion hin am ehesten erwarten kann.

Körpersäfte und Körperzellen nach Art der Leukozyten sind es also, von denen vornehmlich eine Einflufsnahme auf Eintritt und Verlauf einer bakteriellen Infektion vorauszusehen ist, und in der Tat treffen infizierende Bakterien auf diese beiden Elemente des Organismus unter allen Umständen. Sie müssen daher möglichst genau bekannt sein und studiert werden, ehe

man zu einem Verständnisse des komplizierten Infektionsproblems gelangen kann. Die Säfte bieten, wie ja die ganze Geschichte der Forschung lehrt, die leichteste Möglichkeit des Studiums, und ihre Wichtigkeit für systematische Untersuchung geht aus einer einfachen Überlegung klar hervor. Versucht man nämlich, zur Vereinfachung der Sachlage, sich eines der oben erwähnten, für die Infektion bedeutungsvollen Körperelemente aus dem Organismus wegzudenken, um zu sehen, was nach dessen Ausschaltung etwa geschehen könnte, so gelingt das am leichtesten bei den Leukozyten. Das mag wohl seinen Grund in der geringen Kenntnis haben, die man gegenwärtig von der Bedeutung dieser Zellen besitzt, jedenfalls aber kann man sich ohne Mühe einen Organismus vorstellen, der nur aus Säften und spezialisierten Zellformen, wie Drüsen, Muskeln, Nerven usf. besteht. Hingegen läſst sich kein Organismus denken, der nur selbständige und spezifisch ausgebildete Zellen hätte; die Körperflüssigkeit läſst sich nicht ausschalten, höchstens durch eine andere Flüssigkeit ersetzt denken. Es besteht aber aller Grund zu der Annahme, daſs die Körpersäfte — von ihrer sonstigen physiologischen Wichtigkeit abgesehen — weit mehr sind als bloſs das Medium für die unabhängigen Zellen. Es spricht sehr vieles dafür, daſs eine innige Wechselbeziehung zwischen beiden besteht, und daſs die Erkenntnis dieser eine Förderung des Infektions- und Immunitätsproblems bringen wird. Dies hier eingehend zu besprechen, würde zu weit führen und soll an anderer Stelle geschehen. Aber das ist sicher, daſs man die Einflüsse, welche die Körperflüssigkeiten auf die Zellen haben und umgekehrt, nicht richtig studieren kann, ehe man sich nicht über die Wirkungsweise jedes einzelnen Körperelementes bestimmte Vorstellungen gebildet hat und diese begründen kann. Das für die Körpersäfte und deren vornehmste Repräsentanten, das Blutserum zu tun, war der Zweck dieser Arbeit.

Dieselbe muſste sich naturgemäſs Beschränkungen von vornherein auferlegen. Kein Serum einer Tierart ist dem einer anderen gleich, und man findet bei eingehender Beschäftigung mit dem Gegenstande sehr bald, daſs man diesen Satz noch er-

weitern kann, da auch die Sera zweier Individuen derselben Tierart stets Verschiedenheiten aufweisen. Zu den Versuchen mufste daher das günstigste Serum gewählt und dieses ausschliefslich untersucht werden, und das beste war jenes, welches den stärksten Einflufs auf Bakterien ausübte. Als solches wurde das Rinderserum erkannt, wobei nur die Wirkung auf Bakterien dem eigentlichen Zwecke entsprechend in Betracht kam; nur gelegentlich wurde auch eine solche auf Blutkörperchen untersucht und wurden andere Sera (Kaninchen- und Meerschweinchensera) verwendet. Da es sich nur darum handeln konnte, die Möglichkeit und Art der Serumwirkung im allgemeinen zu untersuchen, so wurde als Prüfungsobjekt der. der Serumwirkung am leichtesten zugängliche Mikroorganismus, der Choleravibrio, gewählt.

Von den drei Wirkungen, welche ein Serum auf Bakterien und Bakteriensubstanz ausübt, der agglutinierenden, bakteriziden und präzipitierenden, wurden namentlich die letzteren beiden untersucht, die Untersuchung der ersteren zwar begonnen, aber wegen des grofsen Umfanges, den die dann kaum mehr zu übersehende Arbeit angenommen hätte, nicht zu Ende geführt, was erst später geschehen soll. Für Bakteriolyse und Präzipitation aber kam es hauptsächlich darauf an, festzustellen, ob wirklich eine Nötigung vorliege, besondere, voneinander unabhängige Stoffe Bakteriolysine und Präzipitine anzunehmen, oder ob sich die Serumwirkung nicht notwendig und einheitlich aus der Beschaffenheit und Zusammensetzung des Serums erklären lasse. Eine Übertragung der im Reagenzglase erhaltenen Resultate auf die Verhältnisse des Tierkörpers war weder beabsichtigt, noch wurde sie mit einer Ausnahme, die Wirkung der Präzipitate betreffend, versucht.

In Betracht kommen für jede Seite der Serumwirkung die Reaktion selbst, deren Verlauf und die äufseren Bedingungen derselben (Temperatur etc.), ferner die reagierenden Substanzen, also Bakterien und Bakteriensubstanz auf der einen, das Serum mit seinen analysierbaren Komponenten auf der anderen Seite. Schliefslich wurde noch das Reaktionsprodukt, das am einfachsten

in der Form des Präzipitates zu erhalten ist, etwas näher untersucht. Die ohnedies sehr ausgedehnte Arbeit durch Besprechung der reichen Literatur des Gegenstandes zu vermehren, wurde unterlassen, da sich die Darstellung der Versuche zunächst nur an jene Fachgenossen wenden kann, denen das schwierige Thema ohnedies vertraut genug ist.

## Die Agglutination durch normales Rinderserum.

Wie bereits oben bemerkt wurde, bildete die agglutinierende Wirkung des Rinderserums vorläufig nur einen minder wichtigen Punkt dieser Studien; doch sollen die in mehrfacher Hinsicht interessanten Ergebnisse hier kurz wiedergegeben werden, namentlich soweit die Analogie mit den übrigen Aufserungen der Serumaktivität hervortritt. Eingehendere Studien über dieses Thema wurden von Herrn Dr. Braun im hiesigen Institut angestellt und werden später unter genauerem Eingehen auf die grofse Literatur, das hier erübrigt, veröffentlicht werden.

Die Art des Reaktionsverlaufes ist dieselbe wie die bei Verwendung eines Immunserums zu beobachtende. Binnen kurzer Zeit bei 37°, noch schneller bei höherer Temperatur (Weil) bis 55°, tritt zuerst ein eigentümliches Wogen der Bakterientrübung auf, die sich erst zu kleineren, dann zu groben Flocken zusammenballt, um schliefslich unter Klärung des Serums zu Boden zu sinken, wobei hier viel stärker als in Immunserumverdünnungen auffällt, wie grofs das Volumen des Satzes im Vergleich zu der ursprünglichen Menge der aufgeschwemmten Bakterien ist. Die Volumvermehrung kann sowohl durch Quellung der Vibrionen selbst oder ihrer Teile (Gruber, Dineur u. a.) bedingt sein, wie durch Zusammensetzung der agglutinierten Masse aus den Bakterienleibern und aus der Flüssigkeit mitgerissenen Stoffen (Theorie von Pallauf, Kraus, Löwit u. a.) oder durch beide Momente gleichzeitig.

Die agglutinierende Kraft einer Flüssigkeit kann man auf zweierlei Weise zu bestimmen versuchen. Die meist angewendete Methode besteht darin, auf eine bestimmte Menge Vibrionen fallende

Serummengen zuzusetzen: je gröfser die agglutinierende Serumwirkung ist, desto geringere Mengen Serum sind notwendig, um die Vibrionen vollständig oder eben noch zur Haufenbildung zu bringen. Mit dieser Methode gemessen, ist die Agglutinationskraft normalen Rinderserums nicht eben hoch; selten sind Sera, die bei der Verdünnung 1 : 100, noch seltener solche, welche in noch geringerer Konzentration agglutinieren, meist wird bei einer Verdünnung 1 : 50 oder auch schon 1 : 20 der Effekt gering oder erlischt.

Eine andere Methode besteht darin, zu bestimmen, wieviel Bakterien man einer gleichbleibenden Serummenge zusetzen kann, um noch vollständige oder teilweise Zusammenballung zu erzielen. Die Methode wird wenig angewendet und mit Recht, weil einerseits sehr grofse Kulturmengen verwendet werden müssen, anderseits, weil die Beobachtung von Flockenbildung in sehr trüben Flüssigkeiten schwierig ist und leicht unsicher werden kann. Das Rinderserum ist unverdünnt imstande, sehr grofse Vibrionenmengen zu bewältigen.

Einige Beispiele seien angeführt. Für die erste Methode der Agglutinationsprüfung wurde eine Aufschwemmung von Vibrionenagarkulturen in physiologischer NaCl-Lösung benutzt, die in 1 ccm $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, $^1/_{30}$ od. dgl. Kultur enthält. Bei Ausführung der zweiten Methode wurde z. B. eine Kultur in 1 ccm Serum aufgeschwemmt, davon ein bestimmter Teil, z. B. 0,1 ccm zu 0,9 ccm reinen Serums zugesetzt, so dafs jetzt $^1/_{10}$ Kultur auf 1 ccm Serum einwirkte. Selbstverständlich ist dabei raschestes Arbeiten mit gekühltem Serum notwendig.

I. Je 1 ccm Serum

| + $^1/_{10}$ | $^1/_5$ | $^1/_2$ | 1 | $1^1/_2$ | 2 Kultur |
|---|---|---|---|---|---|
| +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | 0 nach 1 Std. bei 37° |
| +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + » 4 » » 37° |

II. Je 0,5 ccm Serum

| + $^1/_{10}$ | $^1/_{7,5}$ | $^1/_5$ | $^1/_3$ | $^1/_2$ | 1 | $1^1/_2$ Kultur |
|---|---|---|---|---|---|---|
| +++ | +++ | +++ | +++ | + | + | 0 nach 3 Std. bei 37°. |

Schon bei diesen, nur zur Orientierung dienenden Versuchen fällt ein übrigens schon bekannter Umstand auf. Wenn eine bestimmte Serummenge, z. B. eine Agarkultur, noch vollständig agglutiniert, so ist der Bazillensatz bei Zusatz von 2 Kulturen nicht so stark, dafs er einer Kultur entsprechen würde, sondern

viel geringer. Eine Messung ist auf diesem Wege natürlich nicht möglich.

Von Interesse ist es, die Aufhebung der agglutinierenden Serumwirkung durch verschiedene Mittel zu studieren. Das erste hierher gehörige ist die sog. Inaktivierung durch höhere Temperatur.

Die Agglutination der Immunsera ist bekanntlich ziemlich hitzeresistent und selbst eine einstündige Erwärmung des Typhus- oder Choleraserums auf 70—75° genügt nicht in allen Fällen zur Inaktivierung. Für normale Sera sind die Angaben nicht allzureichlich. Landsteiner und Reich[1]) geben für gewisse Agglutinationen eine geringere Resistenz der Normalagglutinine gegen Erhitzung an.

Durch eigene Versuche wurde ermittelt, dafs sich für Rinderserum zwar eine ungefähre obere Grenze der Inaktivierungstemperatur auffinden läfst, über welche hinaus dasselbe meist nicht mehr zu agglutinieren vermag, dafs aber unterhalb derselben nur von einer relativen Inaktivierung gesprochen werden kann.

I. Je $^1/_{20}$ Kultur

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| + 0,1 | 0,02 | 0,01 | 0,005 | 0,002 | ccm Serum |
| +++ | +++ | + | 0 | 0 | aktiv |
| ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | $^1/_2$ Std. auf 56° erhitzt |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | $^1/_2$ » » 62° » |

II. Je $^1/_{20}$ Kultur

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| + 0,2 | 0,1 | 0,05 | 0,02 | 0,01 | 0,005 | ccm Serum |
| +++ | +++ | +++ | ++ | +? | 0 | aktiv |
| +++ | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | $^1/_2$ Std. auf 56° erhitzt |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $^1/_2$ » » 62° » |

III. Je $^1/_{80}$ Kultur

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + 1,5 | 1 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | 0,05 | ccm Serum |
| +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | aktiv |
| +++ | ++ | ++ | +? | 0 | 0 | 0 | $^1/_2$ Std. auf 62° erhitzt. |

Daraus folgt sofort, dafs selbst 62° C noch nicht imstande sind, die agglutinierende Serumwirkung zu vernichten, die nachweisbar bleibt, wenn man nur genügend grofse Serummengen verwendet. Es scheint im allgemeinen der Satz zu gelten, dafs die Agglutination mit steigender Temperatur desto geringer wird.

1) Zentralblatt für Bakteriologie Bd. 39, Nr. 6. Münchener medizin. Wochenschrift 1902, Nr. 46.

Das beweist noch nicht, macht aber wahrscheinlich, dafs das quantitative Moment für die Hitzeinaktivierung das entscheidende ist. Es gibt bis 62° C keinen Temperaturgrad, der die Agglutination aufheben kann, wohl aber wird sie allmählich (mit der Denaturierung des Serums?) zerstört, was natürlich in bezug auf den Effekt um so später eintreten mufs, je stärker die ursprüngliche agglutinierende Kraft war, am spätesten also in einem Immunserum.

Eine andere Methode, die agglutinierende Serumaktivität zu beseitigen, besteht in dem Zusatze von Bakterien, welche nach Grubers Ausdruck die Agglutinine verbrauchen.

I. Das Serum A ist ein frisches aktives Rinderserum, die Sera B, C, D wurden mit $^1/_{100}$, $^1/_{10}$, $^1/_2$ Kultur Cholera für je 1 ccm 1 Std. bei 37° belassen und das abzentrifugierte Serum verwendet.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum . . . | + $^1/_{10}$ | $^1/_4$ | $^1/_2$ | $^3/_4$ | Kultur Cholera |
| Serum A aktiv . . . | +++ | +++ | +++ | ++ | |
| » A $^1/_2$ Std. 56° . | ++ | + | 0 | 0 | |
| 0,2 ccm Serum . . . | + $^1/_{100}$ | $^1/_{40}$ | $^1/_{10}$ | $^1/_2$ | |
| Serum B . . . . . | +++ | +++ | +++ | ++ | |
| » C . . . . . | +++ | +++ | +++ | +? | |
| » D . . . . . | +++ | + | 0 | 0. | |

II. Das Serum A ist aktiv, die Sera B, C, D sind mit $^1/_{10}$, $^1/_4$, $^1/_2$ Kultur Cholera vorbehandelt.

| Je $^1/_{30}$ Kultur | + 0,1 | 0,05 | 0,02 | 0,01 | ccm Serum |
|---|---|---|---|---|---|
| | +++ | +++ | + | 0 | » » A |
| | ++ | + | 0 | 0 | » » B |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | » » C |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | » » D. |

III. Serum A ist aktiv, B, C, D mit $^1/_{10}$, $^1/_3$, $^1/_2$ Kultur Cholera vorbehandelt.

| Je $^1/_{30}$ Kultur | + 0,25 | 0,1 | 0,05 | 0,02 | 0,01 | ccm Serum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | +++ | +++ | +++ | ++ | 0 | » » A |
| | +++ | ++ | 0 | 0 | 0 | » » B |
| | +++ | +? | 0 | 0 | 0 | » » C |
| | +? | 0 | 0 | 0 | 0 | » » D. |

IV. Serum A ist aktiv, B, C, D mit $^1/_8$, $^1/_4$, $^1/_2$ Kultur Cholera vorbehandelt.

| Je $^1/_{30}$ Kultur | + 0,5 | 0,25 | 0,1 | 0,05 | 0,01 | ccm Serum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | — | +++ | +++ | +++ | + | » » A |
| | +++ | +++ | ++ | 0 | 0 | » » B |
| | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | » » C |
| | + | 0 | 0 | 0 | 0 | » » D. |

Bezeichnet man den Agglutinationsverbrauch, den das Serum durch Bakterienbehandlung erfährt, ebenfalls als Inaktivierung desselben, so ist dieselbe ebenso relativ wie die durch Erhitzung erzielte. Eine Erklärung durch quantitative Verhältnisse liegt hier besonders nahe, zumal, wenn man besondere agglutinierende Stoffe annimmt, wie dies meist geschieht.

Auffällig ist dabei, dafs relativ recht geringe Bakterienmengen, die weit kleiner sind, als jene, welche noch vollständig agglutiniert werden, schon eine sehr hochgradige Schwächung des Serums herbeiführen können. So vermag z. B. 0,2 ccm des Versuchsbeispiels I noch $^1/_2$ Cholerakultur zu agglutinieren; wird aber 1 ccm, also die fünffache Menge Serums, mit $^1/_2$ Kultur behandelt, so vermag 0,2 ccm kaum noch $^1/_{40}$ Kultur zu beeinflussen. Es ist bekannt, dafs man diese Erscheinung, unter der Annahme besonderer agglutinierender Stoffe, so erklärt, dafs Bakterien mehr Agglutinine binden können, als zu ihrer Zusammenballung notwendig sind. Sie steht aber offenbar in Analogie mit der oben erwähnten Beobachtung, dafs bei Zusatz von übermäfsig vielen Bakterien eine unerwartet geringe Haufenbildung erfolgt und weitere Analogien ergeben sich, sobald man eine andere Inaktivierung der Serumagglutination, die durch Bakterienextrakte, studiert. Seit den Versuchen von Neifser und Shiga[1]) über freie Bakterienrezeptoren ist bekannt, dafs solche Extrakte den Ablauf der Agglutination hindernd beeinflussen. Weil[2]), der diese Wirkung eingehend studierte, wies die Unhaltbarkeit der Theorie freier Rezeptoren nach unter Bestätigung der von Neifser und Shiga gemachten Beobachtungen. Über die Herstellung der zu den eigenen Versuchen benutzten Extrakte folgen weiter unten (S. 330 ff.) nähere Angaben. Bei Benutzung von Choleravibrionen mufs man zu einer Mischung von aktivem Rinderserum und Vibrionen sehr viel Extrakt zusetzen, um Agglutination zu verhindern.

1) Deutsche medizin. Wochenschrift 1903, Nr. 4.
2) Dieses Archiv Bd. 53.

I. 1/20 Kultur + 0,02 ccm Serum

| +0 | 0,02 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 ccm Choleraextrakt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| +++ | +++ | +++ | ++ | + | +? | 0 | 0 |

II. 1/20 Kultur + 0,05 ccm Serum

| +0 | 0,05 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 ccm Choleraextrakt. |
|---|---|---|---|---|---|
| +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |

Wie immer, verhalten sich auch hier nicht zwei Rindersera vollständig gleich, immer aber ist eine sehr grofse Menge Extraktes (mehr als die 10fache Menge des verwendeten Serums) nötig, um eine Agglutinationsbehinderung, geschweige denn eine Aufhebung derselben herbeizuführen, was mit Weils Versuchen bei Cholera (Typhusbazillen verhalten sich etwas anders) vollständig übereinstimmt.

Ganz anders wirkt der Extrakt, wenn er dem Serum vor den Vibrionen zugesetzt wird. Dabei erfolgt mehr oder weniger starke Präzipitation und nach Entfernung des Präzipitates ist ein grofser Teil der agglutinativen Serumwirkung verloren gegangen.

I. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| I. 4 ccm Serum + 0,4 ccm Choleraextrakt | Bleiben 2 Std. bei 37° (Präzipitation), dann über Nacht kalt stehen und werden dann zentrifugiert. Verwendet wird die 0,1 ccm reinem Serum entsprechende Menge von 0,11, 0,125 etc. ccm. |
| II. 4 » » + 1 » » | |
| III. 4 » » + 4 » » | |
| IV. 4 » » + 4 » NaCl-Lösung | |

| 0,1 ccm Serum | + 1/20 | 1/10 | 1/2 Cholerakultur |
|---|---|---|---|
| Serum I. | +++ | +++ | ++ |
| » II. | +++ | +++ | +? |
| » III. | +++ | + | 0 |
| » IV. | +++ | +++ | +++ |

II. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| I. 5 ccm Serum + 0,5 ccm Extrakt + 4,5 ccm NaCl-Lösung | 1 Std. 37° (Präzipitation) über Nacht kalt gestellt, dann zentrifugiert. |
| II. 5 » » + 2,5 » » + 2,5 » » | |
| III. 5 » » + 5 » » + 0 » » | |
| IV. 5 » » + 0 » » + 5 » » | |

| 1/20 Kultur | + 0,4 | 0,3 | 0,2 | ccm | |
|---|---|---|---|---|---|
| | +++ | ++ | 0 | Serum I | (entsprechend 0,2, 0,15, 0,1 ccm reinen Serums.) |
| | + | 0 | 0 | » II | |
| | 0 | 0 | 0 | » III | |
| | +++ | +++ | +++ | » IV | |

III. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| I. 1 ccm Serum + 0,5 ccm Extrakt<br>II. 1 » » + 1 » »<br>III. 1 » » + 2 » »<br>IV. 1 » » + 0 » » | Über Nacht Zimmertemperatur (Präzipitation), dann zentrifugiert. Unter den gleichen Bedingungen wurde zur Kontrolle das normale Serum gehalten, das in der Menge von 0,02 ccm noch vollständig agglutinierte. |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/30 Kultur + | 0,075 | 0,15 | 0,3 | 0,75 | ccm Serum | I |
| | 0 | 0 | ++ | +++ | | |
| » + | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 1 | » » | II |
| | 0 | 0 | + | +++ | | |
| » + | 0,15 | 0,3 | 0,6 | 1,5 | » » | III |
| | 0 | 0 | 0 | +? | | |
| » + | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | » » | IV |
| | +++ | +++ | +++ | +++ | | |

IV. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| I. 5 ccm Serum + 5 ccm Extrakt<br>II. 5 » » + 2,5 » »<br>III. 5 » » + 1 » »<br>IV. 5 » » + 0 » » | Über Nacht Zimmertemperatur (Präzipitation), dann zentrifugiert. Verwendet werden die 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm reinem Serum entsprechenden Mengen. |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/30 Kultur | +0,5 | 0,25 | 0,1 | 0,05 | ccm | |
| | +++ | ++ | 0 | 0 | » Serum | I |
| | +++ | +++ | + | 0 | » » | II |
| | +++ | +++ | ++ | 0 | » » | III |
| | +++ | +++ | +++ | +++ | » » | IV. |

Es tritt in allen Versuchen ohne Ausnahme und sehr deutlich hervor, dafs der Zusatz von Extrakt, der dann das Entstehen von Präzipitaten veranlafst, eine sehr bedeutende Inaktivierung der agglutinierenden Wirkung des Serums veranlafst, die aber ebenfalls nur relativ ist.

Nach Analogie mit bakteriolytischen Versuchen (Komplementablenkung) könnte man erwarten, dafs ein Überschufs inaktivierten, erhitzten Serums die Agglutination des normalen Rinderserums verhindert. Diesbezügliche Experimente ergaben, dafs ein auf 62° erwärmtes Serum kaum eine merkliche Hemmung auszuüben imstande ist. Dagegen tritt Hemmung durch stärker erhitztes Serum (66°) sehr auffällig hervor, wie Herr Dr. Braun feststellen konnte. Aber schon eine Erhitzung auf 63° genügte in einigen Versuchen zur Agglutinationsverhinderung.

I. 1/30 Kultur + 0,1 ccm Serum

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| +0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 ccm | desgleichen auf 63° erhitztes Serum. |
| +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + » | |

II. $^{1}/_{50}$ Kultur + 0,05 ccm Serum

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + 0 | 0,05 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 ccm | desgleichen auf 63° erhitztes Serum. |
| +++ | +++ | +++ | +++ | + | 0 | 0 » | |

## Die Präzipitation von Cholerasubstanz durch normales Rinderserum.

Gelegentlich ihrer Versuche über die Beziehungen der aggressiven Wirkung der Körperflüssigkeiten infizierter Tiere zu der etwa in ihnen enthaltenen Bazillensubstanz hatten Bail und Weil[1]) die Beobachtung gemacht, dafs normale, immunkörperreiche (nach der Stärke der Bakterizidie beurteilt) Sera, wie das Rinderserum mit konzentrierten Bakterienextrakten Fällungen ergeben. Hoke[2]) hat diesen Gegenstand genauer untersucht und bereits darauf aufmerksam gemacht, dafs die Konzentration der gelösten Bazillensubstanz das Entscheidende für diese Reaktion normaler Sera ist, die kaum spezifisch genannt werden kann. Daraus erklärt sich, dafs Kraus, welcher mit Kulturfiltraten und schwachen Bakterienextrakten arbeitete, eine Präzipitation durch normale Sera, deren Möglichkeit er ausdrücklich erörtert, nicht feststellen konnte. Die Präzipitation tierischer oder pflanzlicher Eiweifslösungen durch Normalsera kommt hier nicht weiter in Betracht. (Kraus, Ascoli, Michaelis, Noguchi, Obermeyer und Pick u. a.)

Die Präzipitation von Choleraextrakten durch normales Rinderserum unterscheidet sich in ihrem Verlaufe und Aussehen nicht von jener, welche spezifisches Immunserum in den gleichen Extrakten hervorbringt. Je nach dem Mengenverhältnisse der reagierenden Flüssigkeiten und sonstigen Umstände (Temperatur) früher oder später tritt eine Trübung auf, die allmählich an Stärke zunimmt, sich erst zu kleinen, dann groben Flocken zusammenballt und absetzt. Strömungen sind in der Flüssigkeit ganz regelmäfsig zu beobachten und scheinen beim Übergange der Trübung in die Flockenbildung am stärksten aufzutreten.

1) Zentralbl. f. Bakt. Bd. 42, Nr. 1 ff.

2) Wiener klin. Wochenschr. 1907.

Von grofsem Einflufs auf die Schnelligkeit der Präzipitation ist die Temperatur. Sie erfolgt zwar schon bei 6—8° anscheinend so vollständig wie nur möglich, aber langsam, schneller bei Zimmertemperatur und 37°, noch schneller bei 45—48°, wo schon nach wenigen Minuten Trübung zu beobachten ist. Es liegt also auch für diese Reaktion des Serums das Optimum über der möglichen Temperatur des lebenden Körpers, wie es auch für die Agglutination durch Weil und Detre u. Sellei, für Bakteriolyse durch Kikuchi festgestellt worden ist.

Spezifisch ist die Präzipitation des Rinderserums nicht. In Extrakten von Typhusbazillen findet ebenfalls Trübung und Ausflockung statt, ein mit ersterem ausgefälltes Serum hat seine präzipitierende Wirkung auf letzteres verloren oder ist doch sehr geschwächt. Man kann daher von einer Vielheit normaler Präzipitine nicht sprechen. Genaue Versuche darüber lagen nicht im Plane dieser Arbeit; wollte man sie anstellen, so müfste man zunächst nach einem Mafsstabe suchen, um die Stärke eines Typhus mit dem eines Choleraextraktes, d. h. die Konzentration der in beiden gelösten Bazillensubstanz zu bestimmen.

Durch sehr verschiedene Momente wird überdies noch die Präzipitation beeinflufst; sie betreffen teils die gelöste Bakteriensubstanz, teils das präzipitierende Serum und werden hier gesondert besprochen. Die Bakteriensubstanz ist im gelösten Zustande in: Filtraten von Bouillonkulturen, Extrakten von Bakterienmassen und Exsudaten infizierter Tiere nachzuweisen. Aber nur Extrakte eignen sich für das Studium der normalen Rinderserumpräzipitation. Weder ältere noch jüngere Bouillonfiltrate (in Übereinstimmung mit Kraus), noch zentrifugierte Peritonealexsudate von Cholerameerschweinchen ergaben einen positiven Reaktionsausfall, ein Beweis für die sehr geringe Konzentration der gelösten Vibrionensubstanz, deren Nachweis durch Präzipitation nur mit Immunserum gelingt. Da, wie später zu zeigen sein wird, die Stärke der normalen Präzipitation sehr gut als Mafs für die Konzentration gelöster Cholerasubstanz gelten kann, so folgt daraus, dafs beim Wachstum von Vibrionen weder im Tiere noch in geeigneten Flüssigkeiten viel Substanz in Lösung

geht. Das schliefst natürlich nicht aus, dafs unter besonderen Kulturbedingungen nicht eine stärkere Lösung eintreten könnte.

Die Konzentration eines Extraktes hängt ab: 1. von der Extraktionsmethode, 2. von der Extraktionsflüssigkeit, 3. von der Menge der extrahierten Vibrionen. Bleiben 2. und 3. gleich, so ist im allgemeinen jene Extraktionsmethode die beste, bei welcher Bakterien in gröfster Zahl zugrundegehen. So liefert Bouillon bei gewöhnlichem Wachstum keine fällbaren Lösungen, wohl aber im Weleminskyschen[1]) Bewegungsapparate, der nicht nur eine bessere Ausnutzung der Nährstoffe durch die Vibrionen gestattet, sondern auch deren Zerfall begünstigt, wie ein mikroskopisches Präparat unmittelbar lehrt. Beständiges Schütteln durch längere Zeit hindurch ist auch das Charakteristikum der Extraktionsmethoden von Brieger, Bassenge u. Meyer[2]) und Wassermann und Citron[3]), mehr noch als die dabei verwendete Extraktionsflüssigkeit, das destillierte Wasser. Erwärmung einer grofsen Menge aufgeschwemmter Kulturen über ihr Temperaturoptimum hinaus durch 1—4 Std. auf 45—60° befördert ebenfalls den Vibrionenzerfall und ergibt starke Extrakte. Anscheinend viel weniger wichtig ist es, ob man als Extraktionsflüssigkeit physiologische Kochsalzlösung oder destilliertes Wasser nimmt, so viele Vorteile letzteres auch wegen seines an sich lösenden Einflusses zu bieten scheint. Namentlich in der Wärme hergestellte Extrakte sind mit Kochsalzlösung ebenso wirksam wie mit destilliertem Wasser. Gerade Hitzeextrakte zeigen deutlich die grofsen Veränderungen an, welche mit der Bakterienmasse vorgegangen sein müssen; nach Verwendung grofser Bakterienmengen sind solche Flüssigkeiten schleimig, beim Zentrifugieren sieht man, wie die meist rein weifs gewordenen schleimigen Bakterienreste sich, mehr weniger zusammenhängend, von der klaren, meist gelblichen Flüssigkeit trennen. Diese selbst ist dann dünnflüssig geworden. Das mikroskopische Bild der extrahierten Kulturen wechselt natürlich, je nach der Intensität der Extraktion.

1) Zentralbl. f. Bakt. Bd. 42, Nr. 3 u. 4.
2) Deutsche med. Wochenschr. 1902.
3) Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 28.

Im äufsersten Falle sieht man unbestimmte, schwach gefärbte (Karbolmethylenblau) Massen, anscheinend feinkörnigen Gefüges, die hie und da noch erkennbare Vibrionen einschliefsen. Bei schwächerer Extraktion ist deren Zahl gröfser. Versuche, die schleimig gewordenen Rückstände genauer zu analysieren, haben zu keinem deutlichen Resultate geführt. Nach Versuchen Weils mit Typhusbazillen gibt eine mehrmalige Extraktion derselben Bazillen keine (durch Agglutinations- und Bakteriolysehemmung) wirksamen Flüssigkeiten mehr.

Meist wurden die Extrakte so hergestellt, dafs die Kulturmasse von Kolleschen Schalen in 5—15 ccm Wasser oder Kochsalzlösung abgespült und dann entweder bei 45-60° C im Wasserbade 1–4 Std. lang erwärmt wurde. Für Schüttelextrakte wurden die Aufschwemmungen in vollständig gefüllte Glasfläschchen, die einige Porzellankügelchen enthielten, gegeben und 24 Std. heftig bewegt. Längeres Schütteln durch 2—3 Tage erhöhte die Ausbeute an gelöster Cholerasubstanz nicht merklich. Da bei dieser Operation nicht selten Verluste durch Verunreinigung während der verschiedenen Manipulationen eintraten, so wurden vielfach einige Tropfen Toluols zugesetzt, ohne dafs dadurch die Extraktion sichtlich beeinträchtigt worden wäre.

Die Menge der Bakterien im Verhältnis zur Menge der Extraktionsflüssigkeit ist natürlich von Bedeutung, insofern mit fallender Menge ersterer die Extrakte immer ärmer an gelöster Vibrionensubstanz werden. Doch hat das seine Grenzen; denn nach der Stärke der sichtbaren Präzipitation zu schliefsen, ist es bei Verwendung der Kulturmasse einer Kolleschen Schale gleichgültig, ob man mit 5 oder mit 20—30 ccm Wasser oder Kochsalzlösung extrahiert. Daraus folgt, dafs ein gewisses Quantum Flüssigkeit nur eine begrenzte Menge Bakteriensubstanz aufnehmen kann. Dadurch sind natürlich auch der Konzentrationsmöglichkeit der Extrakte unveränderliche Grenzen für eine Extraktionsmethode und eine Extraktionsflüssigkeit geboten, die nicht weiter überschritten werden können. Das stimmt mit den Ermittelungen von Axamit[1]) überein, welcher durch mehrmalige

1) Zentralbl. f. Bakt. Bd. 42 Nr. 4 u. 5.

Behandlung von Extrakt mit immer erneuten Vibrionen keine Verstärkung der hämolysehemmenden Wirkung erzielen konnte.

Von erheblicher Bedeutung war bei diesen Versuchen die Feststellung, dafs aktive Sera aufserordentlich schlechte Extraktionsmittel für fällbare Bakteriensubstanz sind. Schon vor längerer Zeit konnten Bail und Kikuchi[1]) feststellen, dafs Schweine-, Rinder-, Schaf- und Pferdeserum nur sehr schlechte Extrakte für Bakteriolysehemmung gaben. Der Grund dieser Erscheinung wurde damals nicht genauer untersucht, doch liefs sich »vermuten, dafs der natürlich hohe Immunkörpergehalt dieser Sera das Wesentliche ist.« Tatsächlich liefs sich nunmehr durch Präzipitationsversuche zeigen, dafs bei Behandlung von Choleravibrionen mit Rinderserum, selbst bei 60°, nur sehr wenig präzipitable Substanz gelöst werden kann: nach Zusatz von frischem aktivem Rinderserum entsteht fast keine Trübung.

A. Vergleich des Einflusses der Bakterienmenge bei gleichbleibender Extraktionsmethode.

I. Der Extrakt A wird mit 1 Schrägagarkultur in 20 ccm $H_2O$ durch 1stünd. Erhitzen auf 56—60° hergestellt, der Extrakt B in gleicher Weise mit der Kulturmasse einer ganzen Kolleschen Schale.

Je 1 ccm Extrakt

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | +1 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | 0,05 ccm Serum |
| A | leicht trüb | leicht trüb | θ | θ | 0 |
| B | Flockung | Flockung | Flockung | trüb | Spur. |

Die Trübung im Extrakt B war bei 1—0,25 ccm Serumzusatz nach ¼ Std. 37° sehr stark, Flockung trat nach 1 Std. ein und setzte sich rasch ab, bei 0,1 trat sie erst nach 4 Std. ein. Nach 24 Std. waren in allen Proben an Stärke abnehmende Sätze vorhanden.

B. Konzentrationsmöglichkeit der Extrakte.

II. In der Reihe A wurde je eine Kollesche Kulturschale mit 5, 10, 20 ccm destillierten Wassers[2]), in der Reihe B mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült, die Aufschwemmung 1½ Std. bei 56° gehalten, dann zentrifugiert.

1) Archiv f. Hygiene Bd. 53 S. 275.

2) Zusatz von Kochsalz nach dem Zentrifugieren der Wasserextrakte wurde wohl vielfach gemacht, ist aber keineswegs notwendig, da das Wasser durch die Extraktion genügend salzreich wird.

Je 1 ccm Extrakt

| | + 1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,05 | 0,02 ccm |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | aktives Rinderserum | | | | | |
| A | Flockung | Flockung | Flockung | schwächer | trüb | leicht trüb |
| B | » | » | » | » | » | » » |

Trübung tritt bei jeder Serummenge schon nach 20' bei 37° auf, nimmt in der Probe mit mehr Serum sehr rasch, sonst nur langsam zu. Flockung tritt nach etwa 1 Std. auf und führt mit steigender Menge immer schneller zur Klärung. Nach 20 Std. überall Bodensätze, bei 0,05 und 0,02 ccm Serum sehr gering. Ein Unterschied in der Fällung war nicht zu bemerken, gleichviel ob nur 5 oder 20 ccm Extraktionsflüssigkeit verwendet waren.

C. Einflufs der Temperatur und des Extraktionsmittels.

III. Extrakt a) 1 Kollesche Schale für 20 ccm Wasser 2 h 44°,
» b) 1 » » » 20 » » 2 » 56°,
» c), » d) wie a und b mit Rinderserum.

| Je 1 ccm Serum + | Extrakt a | b | c | d |
|---|---|---|---|---|
| 0,5 | Sätze; geklärt | wie mit Extrakt a | trüb? | trüb? |
| 0,25 | Sätze; geklärt | wie mit Extrakt a | 0 | 0 |
| 0,1 | Sätze; geklärt | wie mit Extrakt a | 0 | 0 |
| 0,05 | in Flockung | wie mit Extrakt a | 0 | 0 |
| 0,02 | trüb, m. beginn. Flock. | wie mit Extrakt a | 0 | 0 |
| 0,01 | trüb | wie mit Extrakt a | 0 | 0 |

Das Resultat ist nach 6stünd. Beobachtung bei 37° verzeichnet. Auch über Nacht entsteht in den Serumextrakten keine deutliche Präzipitation.

IV. Extrakt I: 1 Kollesche Schale in 13 ccm Wasser 2 Tage geschütt. bei 6—10°.
» II: » » » » » » 2 Std. bei 44°.
» III: » » » » » » 2 » » 56—60°.
» IV, » V, » VI wie I—III mit Rinderserum.

| Je 0,5 ccm Serum + | Extrakt I | II | III | IV—VI |
|---|---|---|---|---|
| 0,5 | Satz; geklärt | Sätze; geklärt | Satz u. Flock. | Ohne Veränderung |
| 0,1 | » » | Sätze; geklärt | do. | Ohne Veränderung |
| 0,05 | geringer Satz | Sätze; geklärt | trüb | Ohne Veränderung |
| 0,01 | trüb | trüb | trüb? | Ohne Veränderung |

Nach 6stünd. Beobachtung bei 37° verzeichnet.

V. Extrakt I: 1 Kollesche Schale in 20 ccm Wasser 2 Std. bei 44°
» II: 1 Kollesche Schale in 20 ccm Wasser 2 Std. bei 56°
» III: 1 Kollesche Schale in 20 ccm akt. Rinderser. 2 Std. b. 44°
» IV: 1 Kollesche Schale in 20 ccm inaktiv. (1/2 Std. 62°) Rinderserum 2 Std. bei 44°

Die Kulturmasse von Extrakt I u. II wird hochgradig schleimig, im Rinderserum, wo beständige Agglutination stattfindet, ist davon nichts zu bemerken.

| | | Extrakt I | Extrakt II | Extr. III | Extrakt IV |
|---|---|---|---|---|---|
| Je 0,5 ccm Serum + | 0,5 ccm | Sätze, geklärt | Wie bei Extrakt I | θ | feinflock. Sätze aber weitaus geringer als b. I u. II |
| | 0,25 » | Sätze, geklärt | Wie bei Extrakt I | θ | feinflock. Sätze aber weitaus geringer als b. I u. II |
| | 0,1 » | Sätze, geklärt | Wie bei Extrakt I | θ | feinflock. Sätze aber weitaus geringer als b. I u. II |
| | 0,02 » | Flocken | Wie bei Extrakt I | θ | θ |

Nach 6std. Beobachtung bei 37° verzeichnet. In Extrakt IV war die Trübung und die Ausfüllung nicht nur unverhältnismäfsig viel geringer als bei I und II, sondern auch sehr verspätet eingetreten. Extrakt III blieb auch weiterhin ohne Präzipitation.

Die Bedeutung der schlechten Eignung des Rinderserums für die Gewinnung gelöster Cholerasubstanz kann erst später gewürdigt werden.

Aufser nach der Stärke der sichtbaren Präzipitation kann der Gehalt eines Extraktes an Bazillensubstanz noch nach der Stärke der Hemmung beurteilt werden, welche er auf verschiedene Serumreaktionen ausübt. Diese Hemmung wurde zuerst wohl von Neifser und Shiga[1]) für die Agglutination aufgefunden und zur Begründung ihrer Theorie der freien Bakterienrezeptoren verwendet; später studierte Weil[2]) das gleiche Thema eingehend an der Agglutination von Typhusbazillen. Von anderen Untersuchern ist namentlich Eisenberg[3]) für die Agglutinationshemmung zu nennen.

Bail und Kikuchi stellten in Übertragung der Versuche von Pfeiffer und Friedberger[4]) über antagonistische Serumsubstanzen auf den Reagenzglasversuch die hemmende Wirkung von Bakterienextrakten auf die Bakteriolyse normalen Serums fest, die Behinderung der Hämolyse bildete den Gegenstand zahlreicher, in verschiedenster Weise modifizierter Versuche, die sich an Wassermanns und seiner Mitarbeiter Bemühungen anschliefsen, durch die sog. Komplementbindung zu einer brauchbaren diagnostischen Methode zu gelangen. Die Literatur dieses Gegenstandes wurde von Weil in einem Referat der »Folia hämatologica« erschöpfend besprochen.

1) Deutsche med. Wochenschr. 1903 Nr. 4.
2) Dieses Archiv, Bd. 53, S. 291.
3) Zentralbl. f. Bakt. Bd. 40, Nr. 1 ff.
4) Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 1.

Vorläufig handelt es sich hier nur darum, einige Beispiele der hemmenden Extraktwirkung zu geben, da deren Mechanismus bei Besprechung der Rinderserumbakteriolyse ausführliche Erörterung finden soll.

I. Extrakt erhalten durch 1 std. Erhitzen der Kulturmasse einer Kolleschen Schale in 40 ccm physiol. Kochsalzlösung bei 56—60°.

a) Agglutination.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $^{1}/_{20}$ Kultur + 0,02 aktives Serum + | 0,02, | 0,1, | 0,2, | 0,4, | 0,6 | 0,8, | 1 ccm Extrakt |
| | +++ | ++ | ++ | + | + | 0 | 0 |

b) Bakteriolyse. Einsaat = ∞; durch Serum allein fast vollständig abgetötet.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm aktives Serum + | 0,05, | 0,1, | 0,2, | 0,4, | 0,6, | 1 ccm Extrakt |
| | 3264 | 4160 | über 10000 | | ∞ | ∞ |

II. Extrakt aus einer Kolleschen Schale mit 20 ccm Wasser, 2 Tage geschüttelt, zentrifugiert 0,08% Na Cl zugesetzt[1]).

a) Agglutination.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $^{1}/_{20}$ Kultur + 0,05 Serum + | 0,05, | 0,25, | 0,5, | 0,75, | 1 ccm Extrakt |
| | +++ | +++ | +++ | ++ | +? |

b) Bakteriolyse. Einsaat ∞.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum + | 0, | 0,05, | 0,1, | 0,2 | 0,5 ccm Extrakt |
| | 0 | 864 | ∞ | ∞ | ∞ |

III. Extrakt I. Eine Kollesche Schale auf 13 ccm Wasser 2 Tage bei 6—10° geschüttelt.

Extrakt II. Eine Kollesche Schale auf 13 ccm Wasser 2 Std. bei 44° geschüttelt.

Extrakt III. Eine Kollesche Schale auf 13 ccm Wasser 2 Std. bei 56—60° geschüttelt.

Extrakt IV, V, VI: Wie I—III mit Rinderserum.

Bakteriolysehemmung. Einsaat = ∞.

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum + | 0,05, | 0,15 Na Cl, | | 0,05, | 0,15 Extr. I, | | 0,05, | 0,15 Extr. II, | |
| | 4 | 2 | | 7 | 11000 | | 1088 | ∞ | |
| 0,2 » » + | 0,05, | 0,15, | Extr. III, | 0,05, | 0,15 Extr. IV, | | 0,05, | 0,15 Extr. V, | |
| | 732 | ∞ | | 0 | 620 | | 19 | 128 | |
| 0,2 » » + | 005, | 0,15 Extr. VI | | | | | | | |
| | 21 | 6400 | | | | | | | |

IV. Extrakt I. Eine Kollesche Schale auf 20 ccm Wasser 2 Std. bei 44°
» II. » » » » 20 » » 2 » » 56°
» III. » » » » 20 » aktives Rinderserum 2 Std. bei 44°
» IV. » » » » 20 » inaktives ($^{1}/_{2}$ Std. bei 62°) Rinderserum 2 Std. bei 44°.

[1]) Ein solcher Extrakt ist tatsächlich hyperisotonisch.

a) Agglutinationshemmung.

$^1/_{20}$ Kultur + 0,05 ccm Serum + 0, 0,5, 1 ccm Extr. I, 0,5, 1 ccm Extr. II,<br>
++++ + θ + θ

$^1/_{20}$ » + 0,05 » » + 0,5, 1 ccm Extr. III, 0,5, 1 ccm Extr. IV<br>
+++ +++ +++ +++

b) Bakteriolysehemmung. Einsaat = ∞

0,2 ccm Serum + 0,05, 0,15 ccm Na Cl, 0,05, 0,15 Extr. I, 0,05,<br>
6400 5840 7120 ∞ 8500

0,2 » » + 0,15 Extr. II, 0,05, 0,1 Extr. III, 0,05, 0,15 ccm Extr. IV<br>
∞ 6300 1528 4800 22000

Es wäre ein ziemlich zweckloses Bemühen, die Stärke eines Extraktes aufs genaueste nach Präzipitation und Serumhemmung auszutitrieren, um dann auf die gleiche Methode immer gleichkonzentrierte Extrakte herstellen zu wollen. Denn wenn dies auch gelänge, so hat man zur Beurteilung der Stärke des Extraktes doch immer nur seine Wirkung auf Serum zur Verfügung, und es sind auch nicht zwei Rindersera einander vollkommen gleichwertig.

Dazu kommt, dafs Extrakte nicht lange unverändert aufbewahrt werden können. Zwar ihre Hitzebeständigkeit ist grofs, und selbst 4 Std. langes Erwärmen auf 60°, 1 Std. Erhitzen auf 70—80° schädigt weder die Präzipitationsmöglichkeit, noch die hemmende Wirkung auf Serumreaktionen in sichtlicher Weise; aber die Haltbarkeit derselben ist trotzdem sehr gering und was das schlimmste ist, die im Laufe der Zeit eintretenden Veränderungen sind durchaus regellos und lassen sich nicht vorherbestimmen. Im allgemeinen nehmen die Extrakte mit zunehmendem Alter sowohl in der Präzipitationsfähigkeit als namentlich in ihrer hemmenden Fähigkeit ab, aber eine Regelmäfsigkeit wurde nicht gefunden. Von zwei auf gleiche Weise gewonnenen Flüssigkeiten schien die eine nach 2—3 Wochen fast unverändert zu hemmen, die andere war nach einer Woche schon fast wirkungslos geworden. Dabei können die Extrakte äufserlich anscheinend unverändert bleiben oder sinnfällige Änderungen erfahren. Nicht selten wurden sie bei vollkommener Sterilität trübe und liefsen einen geringen, weifsen, schleimigen Bodensatz ausfallen. Ob die Extrakte mit oder ohne Konservierungsmittel aufgehoben werden (Toluol, Chloroform) scheint keinen

Unterschied zu bedingen, ist aber wegen der Regellosigkeit der sonstigen Befunde schwer zu beurteilen. Dieses Verhalten teilen die hier angewendeten Extrakte mit vielen andern, die neuestens zum Studium der Komplementbindung viel verwendet werden, und worüber sich Wassermann, Neifser, Bruck und Schucht[1]) ausführlich geäufsert haben. Öfters wurde beobachtet, dafs ältere Extrakte mit Rinderserum zwar noch Trübung ergaben, dafs es aber zu einer Ausflockung nicht kam.

Es ist klar, dafs durch diese Eigentümlichkeit das Arbeiten mit Bakterienextrakten sehr erschwert wird, und dafs es eine grofse Erleichterung wäre, wenn man den Grund der Veränderlichkeit angeben könnte. Für die folgenden Versuche wurden nie Extrakte, die älter als höchstens 7 Tage waren, verwendet; auch dabei mufs für jedes Serum erst die Wirkung, wenigstens ungefähr, ausgeprobt werden.

Filtration durch keimdichte Filter vermindert die Wirksamkeit der Extrakte aufserordentlich, doch scheint, wie das ja immer der Fall ist, viel auf die Beschaffenheit des Filters anzukommen.

Extrakt aus zwei Kolle-Schalen mit 40 ccm Wasser, 2 Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt, die eine Hälfte a, wie gewöhnlich zentrifugiert, die andere b durch Berkefeld-(Liliput) Filter filtriert.

| | 0,2, 0,4, 0,8 ccm Extrakt a | 0,2, 0,4, 0,8 ccm Extrakt b |
|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum + | Typische Flockung und Satzbildung binnen 2 Std. | auch nach 12 Std. keine Trübung. |

Von einem gewissen, allerdings nicht ganz sicheren Einflusse auf die normale Rinderserumpräzipitation ist die Menge des zur Reaktion verwendeten Extraktes. Dafs bei zu geringem Zusatze von Extrakt die Niederschlagsbildung wenn auch vielleicht nicht ausbleibt, doch unsichtbar wird, ist natürlich. Die kleinsten Mengen Extraktes, die noch direkt zu Serum zugesetzt werden können, also etwa 0,02 ccm, rufen noch Niederschläge hervor, ja man kann bisweilen beobachten, wie das Einfallenlassen eines Tröpfchens Extraktes in das Serum einen trüben Streifen beim Untersinken nach sich zieht. Ganz anders ver-

1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 55, Nr. 3.

halten sich verdünnte Extrakte, die schon sehr bald keine Präzipitation mehr erkennen lassen, auch wenn man 24 Stunden lang beobachtet. Eine Menge von 0,05 und selbst von 0,1 ccm Extrakt, auf das 5—10fache verdünnt, läfst bei Zusatz von gleichviel Serum oder selbst mehr oft schon keine Trübung erkennen, mindestens wird aber die Reaktion aufserordentlich verzögert. Es ist klar, dafs diese Erscheinung mit der anderen, eingangs erwähnten, zusammenhängt, dafs normales Rinderserum mit Bouillonkulturfiltration wegen zu geringer Konzentration der gelösten Vibrionensubstanz nicht mehr reagiert.

Auffallender ist, dafs bei Anwendung kleiner Serummengen für grofse Extraktquantitäten ebenfalls ein Ausbleiben oder doch eine Verzögerung der Präzipitation in einzelnen Fällen festzustellen war.

I. Der auffallendste Versuch ist der folgende mit einem Schüttelextrakt (eine Kollesche Schale auf 20 ccm Wasser).

| | Rinderserum | | NaCl-Lösung | | Extrakt | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | + | 2,15 ccm | + | 0,1 ccm | Fällung trat in 1 zwar sehr verspätet ein, doch waren nach 6 Std. bei° 37 grobe Flocken z. T. abgesetzt, ebenso in 2; 3—4 waren höchstens trübe. Beim Stehen der Proben über Nacht war 1 und 2 abgesetzt, in 3 fand sich ein sehr geringer Satz, 4 und 5 waren unverändert geblieben. |
| 2. | 0,25 » | + | 1,75 » | + | 0,5 » | |
| 3. | 0,25 » | + | 1,25 » | + | 1,0 » | |
| 4. | 0,25 » | + | 0,75 » | + | 1,5 » | |
| 5. | 0,25 » | + | 0 » | + | 2,25 » | |

II. Gleich der nächste Versuch mit einem neuen Serum und dem inzwischen 4 Tage alten Extrakte verlief aber anders.

| | Rinderserum | | NaCl-Lösung | | Extrakt | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | + | 2,25 ccm | + | 0,25 ccm | Nach 6 Std. bei 37° war die Präzipitation vollendet, die Stärke der Sätze nahm von 1—4 zu. |
| 2. | 0,25 » | + | 2 » | + | 0,5 » | |
| 3. | 0,25 » | + | 1,5 » | + | 1 » | |
| 4. | 0,25 » | + | 0,5 » | + | 2 » | |

III. Extrakt durch Schütteln bei Zimmertemperatur 24 Std. lang geschüttelt.

| | Serum | | Extrakt | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm | + | 0,8 ccm | Nach 6 Std. bei 37° ist 1 nur trüb, ohne Flockenbildung, in 2 beginnt erst die Bildung kleinster Flöckchen, 3 ist etwas weiter fortgeschritten, 4—6 sind klar mit Sätzen typischer Präzipitation. Über Nacht haben sich überall Sätze gebildet, am schwächsten in 1 u. 2. |
| 2. | 0,2 » | + | 0,6 » | |
| 3. | 0,2 » | + | 0,4 » | |
| 4. | 0,2 » | + | 0,2 » | |
| 5. | 0,2 » | + | 0,1 » | |
| 6. | 0,2 » | + | 0,05 » | |

IV. Extrakt durch 1 std. Erwärmen einer Kolleschen Schalenkultur in 25 ccm NaCl-Lösung.

| | Serum | | Extrakt | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm | + | 2 ccm | Schon nach 1 Std. ist 4 u. 5 in voller Ausflockung, 2 u. 3 sind trübe, 1 ist unverändert. Nach 6 Std. sind die Präzipitationen in 4 u. 5 beendet, in 3 beginnt Bildung vieler feiner Flocken und 1 u. 2 sind nur trüb. Über Nacht haben sich überall Sätze gebildet, die in 1 u. 2 nur sehr gering sind. |
| 2. | 0,2 » | + | 1,5 » | |
| 3. | 0,2 » | + | 1 » | |
| 4. | 0,2 » | + | 0,6 » | |
| 5. | 0,2 » | + | 0,2 » | |

Diese merkwürdigen Befunde waren, wie erwähnt, nicht die Regel, öfters entstand auch bei grofsen Mengen Extraktes typische starke Ausflockung. Sie würden deshalb gar nicht erwähnt worden sein, wenn nicht einerseits die Beobachtung einer Trübung, die nur sehr schwer und unvollständig in Ausflockung übergeht, an das Verhalten mancher spontan durch Altern veränderter Extrakte erinnern würde und anderseits nicht analoge Befunde bei sonstigen Präzipitationsvorgängen beobachtet worden wären, und zwar für spezifisch präzipitierende Sera durch Eisenberg[1]), Moll[2]), Michaelis[3]), Rostoski[4]) u. a. Auch die Feststellung Schurs[5]), dafs bei gleichbleibenden Mengen von präzipitierendem Serum mit Erhöhung des Präzipitinogenzusatzes eine Abnahme der Präzipitatbildung eintritt, gehört hierher.

In bezug auf das Serum kommt zunächst dessen absolute präzipitierende Kraft in Betracht. Es wurde kein normales Rinderserum gefunden, das nicht einen durch seine Konzentration überhaupt geeigneten Extrakt hätte ausfällen können, und schon 0,05 ccm genügten in der Regel, um Trübung mit nachfolgender Flockung herbeizuführen. In Verdünnungen schon geringen Grades nimmt die Präzipitationskraft rasch ab und mindestens erfolgen starke zeitliche Verspätungen.

Mit dem Älterwerden des Serums schwindet auch die präzipitierende Wirkung; gleichmäfsig verhalten sich die verschiedenen Sera hier ebensowenig, wie in bezug auf Bakteriolyse, wo ebenfalls manche Sera bei kühler Aufbewahrung schon nach drei Tagen

1) Zentralbl. f. Bakt. 1902.
2) Hofmeisters Beitr., Bd, 5. Nr. 12, 1903.
3) Ebenda, Bd. 5, 1903.
4) Zitiert n. Kraus. Handb. d. pathol. Mikroorganismen.
5) Handb. d. pathogenen Mikroorganismen, Bd. 4, S. 630.

stark entwertet sind, während die meisten auch nach einer Woche noch wenig eingebüfst haben. Zu den Versuchen wurden übrigens fast ausschliefslich nur frische, höchstens 24 Stunden alte Sera verwendet.

Die Thermolabilität der Präzipitationswirkung ist eine ausgesprochene, aber wie bei der Agglutination läfst sich auch hier feststellen, dafs die Hitzeinaktivierung innerhalb gewisser Temperaturgrenzen nur eine relative ist. Die Präzipitation wird leichter vernichtet als die Agglutination, aber schwerer als die Bakteriolyse des gleichen Serums: ½—1 stdg. Erwärmung auf 56° schädigt sie bedeutend, Temperaturen von 62—63° vernichten sie praktisch vollständig.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I. 0,5 ccm Extrakt + | 0,25, | 0,1, | 0,05, | 0,02 | | ccm Serum |
| | +++ | +++ | +++ | + | | aktiv |
| | ++ | 0 | 0 | 0 | | ½ Std. 56° |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | | ½ » 62° |
| II. 1 ccm Extrakt + | 1, | 0,75, | 0,5, | 0,25, | 0,1 | ccm Serum |
| | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | |
| | +++ | ++ | + | + | 0 | ½ Std. 56° |
| | +? | 0 | 0 | 0 | 0 | ½ » 62° |
| III. 1,5 ccm Extrakt + | 1, | 0,5, | 0,25, | 0,1, | 0,05 | ccm Serum |
| | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | aktiv |
| | +++ | ++ | +? | 0 | 0 | ½ Std. 56° |
| | + | ? | 0 | 0 | 0 | ½ » 62° |

Im allgemeinen stimmt diese Inaktivierungstemperatur des normalen Rinderserums mit der der präzipitierenden Immunsera überein, die ebenfalls über 60° hinaus ihre Fällungskraft für Bakteriensubstanz verlieren (Pick, Kraus u. Pirquet u. a.). Wie Kraus und Pirquet[1]) zuerst feststellen konnten, ist die Zerstörung keine vollständige, sie betrifft bei Annahme besonderer präzipitierender Stoffe im Serum nur deren fällende, nicht die bindende Gruppe, ähnlich wie bei Agglutininen. Nach der Vorstellungsweise Ehrlichs würden also die Präzipitine Rezeptoren zweiter Ordnung darstellen, bei denen ein Ersatz der verlorenen Fällungskraft nicht gelingt. Da aber für Agglutinine verschiedener Art die Ergänzungsmöglichkeit nach vorheriger Erhitzung durch

1) Zentralbl. f. Bakt. 1902, Bd. 32.

Bail[1]), Shibayama[2]), Eisenberg[3]), Lüdke[4]) bereits für besondere Fälle nachgewiesen wurde, so besteht auch für die Präzipitation die Wahrscheinlichkeit eines ähnlichen Verhaltens. Für die agglutinierende Wirkung des normalen Rinderserums hat Braun bereits den Nachweis ihrer Komplexität erbringen können, für die präzipitierende ist er in befriedigender Weise noch nicht gelungen, was durch die Schwierigkeit solcher Versuche ohne weiteres erklärt wird; darüber wird später noch einiges zu sagen sein.

Es gibt noch andere Momente, welche aufser der Hitze die Präzipitation des normalen Rinderserums beeinträchtigen. Eines der interessantesten liegt in der Beobachtung, dafs Steigerung der Menge des Serums über ein gewisses Mafs hinaus die Reaktion verhindert oder doch verzögert. Eine vollständige Konstanz war leider in diesen Versuchsreihen ebensowenig zu erzielen wie bei den analogen mit einer Steigerung der Extraktmenge (s. S. 338), doch ist an dem Vorkommen dieser Erscheinung nicht zu zweifeln.

| | Extrakt | | aktives Serum |
|---|---|---|---|
| I. 1. | 0,5 ccm | + | 10 ccm |
| 2. | 0,5 » | + | 5 » |
| 3. | 0,5 » | + | 1 » |
| 4. | 0,5 » | + | 0,5 » |
| 5. | 0,5 » | + | 0,25 » |
| 6. | 0,5 » | + | 0,1 » |

Nach 1 Std. sind die Proben 1 u. 2 trübe, 3 ist sehr trüb mit beginnender Flockung, die übrigen trübe. Nach 2 Std. ist die Trübung unter 2 etwas verstärkt, 3—5 sind in voller Ausflockung, 6 ist trübe. Nach 4 Std. ist es in 1 u. 2 zu keinerlei Ausflockung, eher zu einer Aufhellung der Trübung gekommen, in 3—5 ist die Reaktion unter starker Satzbildung beendet, in 6 ist ein geringer Satz neben Trübung vorhanden.

Erst nach Stehenlassen der Proben über Nacht ist auch in 1 u. 2 Satzbildung eingetreten.

| | Extrakt | | aktives Serum |
|---|---|---|---|
| II. 1. | 0,1 ccm | + | 10 ccm |
| 2. | 0,1 » | + | 5 » |
| 3. | 0,1 » | + | 1 » |

Die Proben werden im Wasserbade bei 44° beobachtet. Schon nach 1/2 Std. ist 3 in voller Ausflockung, die Flocken setzen sich rasch ab. 1 u. 2 werden rasch trübe, es kommt aber zu keiner Flockenbildung, die Trübung hellt sich nach 3 Std. auf und nach 5 Std. sind beide Proben klar geworden; auch bei Stehen in Zimmertemperatur über Nacht entsteht keine Satzbildung.

1) Dieses Archiv, Bd. 52.
2) Zentralbl. f. Bakt., Bd. 42, Nr. 1.
3) Zentralbl. f. Bakt., Bd. 40, Nr. 1 ff.
4) Zentralbl. f. Bakt., Bd. 42, Nr. 1 ff.
5) Handb. v. Kolle-Wassermann. Bd. 4, S. 627.

| | Extrakt | aktives Serum | |
|---|---|---|---|
| III. 1. | 0,25 ccm | + 15 ccm | Beobachtet bei 44°. In 1 entsteht überhaupt keine deutliche Trübung, in 2 u. 3 ist sie nach 1 Std. da, flockt aber während 5 Std. nicht aus. Über Nacht entsteht ein geringer Satz. Die übrigen Proben zeigen typische Präzipitation. |
| 2. | 0,25 » | + 12,5 » | |
| 3. | 0,25 » | + 10 » | |
| 4. | 0,25 » | + 5 » | |
| 5. | 0,25 » | + 1 » | |
| 6. | 0,25 » | + 0,25 » | |

Es ist sehr zu bedauern, dafs solche Versuche nicht mit allen, sondern nur mit einigen Seren gelangen. In der Regel trat bei Serumüberschufs nur eine Verzögerung der Flockenbildung ein, die natürlich bei den ungleichen Verhältnissen, wie sie eine Gesamtmenge der Flüssigkeit von ca. 15 ccm in der einen, von 1 ccm in der andern Probe darbieten, schwer zu beurteilen ist. Deshalb soll eine nähere Erörterung dieser Versuchsresultate unterbleiben und nur darauf hingewiesen werden, dafs Kraus[6]) an präzipitierendem Choleraimmunserum analoge Verhältnisse beobachten konnte. Inwiefern die Hemmung der Präzipitation, welche namentlich Landsteiner und Halban und Michaelis für normale Sera unter anderen Versuchsbedingungen beschrieben haben, eine Rolle spielt, läfst sich nicht entscheiden.

Zusatz von inaktiviertem (62°) Rinderserum hemmt die Präzipitation durch normales regelmäfsig, nur die quantitativen Verhältnisse, in denen bei verschiedenen Seren die Hemmung eintritt, wechseln einigermafsen.

| | | |
|---|---|---|
| I. 1. | 0,25 ccm Extrakt + 1 ccm akt. Rinderserum + 5 ccm Rinderserum ½ Std. 62° | Beobachtung bei 37°. Nach ⁵/₄ Std. beginnt Ausflockung in 2 u. 3, die sich bald absetzt. In 1 bleibt jede Reaktion aus, auch bei 24 std. Beobachtung. |
| 2. | 0,25 ccm Extrakt + 1 ccm akt. Rinderserum + 5 ccm Rinderserum aktiv | |
| 3. | 0,25 ccm Extrakt + 1 ccm akt. Rinderserum + 5 ccm NaCl-Lösung | |

| | | |
|---|---|---|
| II. 1. | 0,1 ccm Extrakt + 0,25 ccm aktives Rinderserum + 2,25 ccm NaCl-Lösung | Verzeichnet nach 6 std. Beobachtung bei 37°. In 1 u. 2 grobe z. T. abgesetzte Flocken. In 3 u. 4 feinste nicht abgesetzte Flocken; 5, 6, 7 keine Veränderung. Nach 24 St. 1, 2 stärker, 3, 4 viel schwächerer Satz, 5 minimaler Satz, 6, 7 0 |
| 2. | 0,1 ccm Extrakt + 0,25 ccm aktives Rinderserum + 2,0 ccm NaCl-Lös. + 0,25 ccm Rinders. ½ Std. 63° | |
| 3. | 0,1 ccm Extrakt + 0,25 ccm aktives Rinderserum + 1,5 ccm NaCl-Lös. + 0,75 ccm Rinders. ½ Std. 63° | |
| 4. | 0,1 ccm Extrakt + 0,25 ccm aktives Rinderserum + 1 ccm NaCl-Lös. + 1,25 ccm Rinders. ½ Std. 63° | |
| 5. | 0,1 ccm Extrakt + 0,25 ccm aktives Rinderserum + 0,5 ccm NaCl-Lös. + 1,75 ccm Rinders. ½ Std. 63° | |
| 6. | 0,1 ccm Extrakt + 0,25 ccm aktives Rinderserum + 0 ccm NaCl-Lös. + 2,25 ccm Rinders. ½ Std. 63° | |
| 7. | 0,1 ccm Extrakt + 0 ccm aktives Rinderserum + 0 ccm NaCl-Lös. + 2,5 ccm Rinders. ½ Std. 63° | |

III. 1. 0,2 ccm Extrakt + 0,2 ccm aktives Rinderserum + 2 ccm NaCl-Lösung
2. 0,2 ccm Extrakt + 0,2 ccm aktives Rinderserum + 1,8 ccm NaCl-Lös. + 0,2 ccm Rinders. $^1/_2$ Std. 62°
3. 0,2 ccm Extrakt + 0,2 ccm aktives Rinderserum + 1,4 ccm NaCl-Lös. + 0,6 ccm Rinders. $^1/_2$ Std. 62°
4. 0,2 ccm Extrakt + 0,2 ccm aktives Rinderserum + 1 ccm NaCl-Lös. + 1 ccm Rinders. $^1/_2$ Std. 62°
5. 0,2 ccm Extrakt + 0,2 ccm aktives Rinderserum + 0,6 ccm NaCl-Lös. + 1,4 ccm Rinders. $^1/_2$ Std. 62°
6. 0,2 ccm Extrakt + 0,2 ccm aktives Rinderserum + 0 ccm NaCl-Lös. + 2 ccm Rinders. $^1/_2$ Std. 62°
7. 0,2 ccm Extrakt + 0 ccm aktives Rinderserum + 0 ccm NaCl-Lös. + 2 ccm Rinders. $^1/_2$ Std. 62°

Beobachtung bei 37°. Nach 1 Std. ist in 1 grobe Flockenbildg. eingetreten, die sich z. T. schon abgesetzt hat, 2 ist voll feinster Flöckchen, 3 ist trübe, 4—7 unverändert. Nach 6 Std. ist 1 u. 2 (letzt. schwächer) abgesetzt, in 3 findet sich ein sehr gering. Satz, die übr. Prob. sind unveränd.

Die mitgeteilten Versuche betreffen Sera von relativ starker Präzipitationskraft, der die Verdünnung nicht allzu viel schadet. Man vermeidet sie aber besser.

IV. 1. 0,25 ccm Extrakt + 0,25 ccm akt. Rinderser.
2. 0,25 ccm Extrakt + 0,25 ccm akt. Rinderser. + 0,25 ccm Rinderserum $^1/_2$ Std. 62°
3. 0,25 ccm Extrakt + 0,25 ccm akt. Rinderser. + 1 ccm Rinderserum $^1/_2$ Std. 62°
4. 0,25 ccm Extrakt + 0,25 ccm akt. Rinderser. + 2,5 ccm Rinderserum $^1/_2$ Std. 62°
5. 0,25 ccm Extrakt + 0 ccm akt. Rinderserum + 2,5 ccm Rinderserum $^1/_2$ Std. 62°

Beobachtung bei 37°: Schon nach $^1/_2$ Std. ist 1 sehr trübe, nach 1 Std. ist 1 in voller, 2 in beginnender Ausflockung, die übr. sind unveränd. Nach 6 Std. ist d. Präzipitation in 1 vollendet, 2 enthält Flocken, 3—5 sind und bleiben auch nach 24 Std. unverändert.

Es ist klar, dafs die Analogie dieser Hemmung der normalen Präzipitation mit den Befunden an spezifisch präzipitierenden Immunseren eine vollständige ist. Derartige Hemmungen waren die Veranlassung, dafs Kraus und Kraus und v. Pirquet zu der Annahme zweier Gruppen im Serumpräzipitin, einer fällenden und einer bindenden geführt wurden. Die fällende Gruppe wird durch Erhitzen und andere Eingriffe leicht ausgeschaltet, die bindende bleibt erhalten, erlangt als Präzipitoid eine höhere Avidität zum Präzipitinogen (also zur gelösten Bakteriensubstanz) und macht daher dieses durch ihre Anlagerung unausfällbar. Dadurch wurde die Präzipitation in vollständige Analogie mit den Vorstellungen gebracht, die über die Agglutination entwickelt wurden. Trifft diese Vorstellungsweise zu, so mufs auch das normalerweise im Rinderserum vorhandene Präzipitin imstande sein, in Präzipitoid überzugehen.

Ein anderes Moment, welches die präzipitierende Kraft eines Rinderserums aufhebt, ist eine vorangegangene Präzipitation, wieder vollständig analog dem Verhalten spezifisch präzipitierender Sera. Unter der Annahme besonderer präzipitierender Serumstoffe drückt man das so aus, dafs die Präzipitine bei der Reaktion verbraucht werden. Für das Rinderserum ist, wie bereits bemerkt wurde, der Präzipitinverbrauch kein spezifischer, eine vorhergehende Ausfällung mit Typhusbazillenextrakt mindert die Präzipitationskraft für Cholerasubstanz und umgekehrt.

I. Es werden hergestellt:

| | akt. Rinderserum | Extrakt | Na Cl-Lösg. |
|---|---|---|---|
| Serum a | 3 ccm | + 0,3 ccm | + 1,2 ccm |
| » b | 3 » | + 0,75 » | + 0,75 » |
| » c | 3 » | + 1,5 » | + 0 » |
| » d | 3 » | + 0 » | + 1,5 » |

Binnen $1/2$ Std. tritt in a—c Trübung ein, die rasch in Flockung übergeht. Über Nacht bilden sich von a—c an Stärke zunehm. Sätze, die abzentrifugiert werden. Die klare Flüssigkeit dient zu folgendem Versuche:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm Extr. | + 0,75 ccm | Serum a |
| 2. | 0,25 » | + 0,75 » | b |
| 3. | 0,25 » | + 0,75 » | c |
| 4. | 0,25 » | + 0,75 » | d |

Beobachtet nach 3 std. Aufenthalt bei 37°. In 1 starke Trübung, die nach 5 Std. in Ausflockg. übergegangen ist. In 2 Trübg., die nicht ausflockt, 3 ohne Verändg., 4 beend. Reaktion. Nach Stehen üb. Nacht hat sich in 4 starker, in 1 schwacher, in 2 minim. Satz gebildet, 3 blieb unverändert.

II. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Serum a | 4 ccm akt. Rinderser. | + 0,4 ccm Extr. | |
| » b | 4 » | + 1 » | |
| » c | 4 » | + 4 » | |
| » d | 4 » | + 4 ccm Na Cl-Lösg. | |

Die beim Stehen d. Proben über Nacht in Zimmertemp. gebildeten, von a zu c an Stärke zunehmend. Bodensätze werd. abzentrifug. und die klare Flüssigkeit wird zu folgendem Versuch verwendet:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,3 ccm Extrakt | + 0,44 ccm | Serum a |
| 2. | 0,3 » | + 0,11 | » |
| 3. | 0,3 » | + 0,5 ccm | » b |
| 4. | 0,3 » | + 0,125 | » |
| 5. | 0,3 » | + 0,8 | » c |
| 6. | 0,3 » | + 0,2 | » |
| 7. | 0,3 » | + 0,8 | » d |
| 8. | 0,3 » | + 0,2 | » |

Nach 3 Std. Beobachtung bei 37° ist 1 deutlich, 3 spurenweise trüb, 7 u. 8 sind flockig abgesetzt, die übrig. Prob. sind klar. — Beim Stehenlass. üb. Nacht hat sich in 1 ein mäfs., in 2 u. 3 ein minim. Satz gebild., 4—6 sind unverändert, 7 u. 8 haben starke Bodensätze.

III. Es werden hergestellt:

| | akt. Rinderserum | Extrakt | Na Cl-Lösg. | |
|---|---|---|---|---|
| Serum a | 5 ccm | + 0,5 ccm | + 4,5 ccm | Flockenbildg. erfolgt in a langsam, in b u. c sehr rasch, nach Stehenlassen d. Proben üb. Nacht werden dieselb. zentrifugiert und |
| » b | 5 » | + 2,5 » | + 2,5 » | |
| » c | 5 » | + 5 » | + 0 » | |
| » d | 5 » | + 0 » | + 5 » | |

zu folgendem Versuche verwendet:

| | |
|---|---|
| 1. 0,25 ccm Extr. + 1 ccm Ser. a<br>2. 0,25 » + 0,5 »<br>3. 0,25 » + 0,2 » | Nach $1/2$ Std. ist 1 deutl., 2 vielleicht trübe. Nach 1 Std. beginnt in 1 Flockenbildg., 2 ist deutl., 3 leicht trüb, nach 2 Std. ist 1 in voller, 2 in beginn. Ausflockg., 3 ist trüb. Nach 4 Std. ist die Reaktion in 1 u. 2 beend., 3 ist ohne Flockenbildung trüb. |
| 4. 0,25 ccm Extr. + 1 ccm Ser. b<br>5. 0,25 » + 0,5 »<br>6. 0,25 » + 0,2 » | Nach $1/2$ Std. ist 4 spurenweise trüb, nach 1 Std. beginnt undeutl. Flockenbildg., 5 u. 6 sind unveränd. Nach 4 Std. ist d. Reakt. in 4 beend., 5 ist trüb mit beginn. Flockenbildung, 6 ist und bleibt unverändert. |
| 7. 0,25 ccm Extr. + 1 ccm Ser. c<br>8. 0,25 » + 0,5 »<br>9. 0,25 » + 0,2 » | Nach $1/2$ u. 1 Std. sind alle Prob. unveränd., erst nach 3 Std. beginnt in 7 Trübung, die nach 4 Std. in volle Ausflockg. übergeht. Es bildet sich ein Satz, der aber nur gering ist. 8 u. 9 bleiben auch nach 24 Std. unveränd. |
| 10. 0,25 ccm Extr. + 1 ccm Ser. d<br>11. 0,25 » + 0,5 »<br>12. 0,25 » + 0,2 » | Nach $1/2$ Stde. ist überall Trübung, nach 1 Std. in 10 und 11 volle, in 12 beginnende Ausflockung eingetreten, nach 3 und 4 Std. ist die Reaktion überall beend. |

Man erkennt in den mitgeteilten Versuchsbeispielen ohne weiteres den Verlust an Präzipitationskraft des normalen Rinderserums, der um so stärker wird, je mehr Extrakt bei der ersten Ausfällung angewendet wurde. Der Versuchsausfall ist ein ganz natürlicher, da bei der Annahme präzipitierender eigener Stoffe im Serum diese sich durch die Reaktion, in welche sie selbst eintreten, notwendig erschöpfen müssen.

Viel weniger aber ist diese Annahme geeignet, eine andere Erscheinung zu erklären, die leicht zu beobachten ist und die darin besteht, dafs auch eine vorhergehende Behandlung des normalen Rinderserums mit morphologisch erhaltenen, lebenden Vibrionen die präzipitierende Serumwirkung aufhebt oder vermindert.

I. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum a 2 ccm akt. Rinderserum + 1 ccm Extrakt<br>» b 2 » + 2 » Agarkultur Cholera in 1 ccm Na Cl-Lösg.<br>» c 2 ccm akt. Rinderser. + 1 ccm Na Cl-Lösg. | Üb. Nacht b. Zimmertemp. gelassen, zeigt Ser. a beend. Präzipit., Ser. b vollkomm. Agglut. (die sich nach Zerschütteln immer wieder rasch herstellt). |

Alle Proben werden zentrifugiert und die klare Flüssigkeit zu folgendem Versuche verwendet:

| | Extrakt | Serum c | Na Cl-Lös. | Rinderserum | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm | + 0,3 ccm | + 0,7 ccm | | | In kurz. Zeit Trübg. mit Ausflockg., nach 4 Std. ist die Reaktion überall beendet. |
| 2. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0,45 » | + 0,25 ccm | $^1/_2$ St 61° | |
| 3. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0,2 » | + 0,5 » | | |
| 4. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0 » | + 0,7 » | | |

| | Extrakt | Serum a | Na Cl-Lös. | Rinderserum | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5. | 0,2 ccm | + 0,3 ccm | + 0,7 ccm | | | Die Probe 5 bleibt nach 4 u. 6 st. Beobachtg. bei 37° unveränd. und zeigt auch weiterhin keine Niederschlagsbildung. 6—8 zeig. b. z. 4 St. keine Reaktion, dann beginnt Trübg., die von 6—8 an Stärke zunehmen, aber nach 6 St. noch zu kein. Ausflock. geführt hatte. Über Nacht bildeten sich geringe Sätze. |
| 6. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0,45 » | + 0,25 ccm | $^1/_2$ St 61° | |
| 7. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0,2 » | + 0,5 » | | |
| 8. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0 » | + 0,7 » | | |

| | Extrakt | Serum b | Na Cl-Lös. | Rinderserum | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 9. | 0,2 ccm | + 0,3 ccm | + 0,7 ccm | | | Zwischen 3 u. 4 Std. entstand i. all. Prob. Trübg., die sehr langs. in Bildg. kleinst. Flock. überging. Über Nacht bildet. sich schwache Sätze. |
| 10. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0,45 » | + 0,25 ccm | $^1/_2$ St. 61° | |
| 11. | 0.2 » | + 0,3 » | + 0,2 » | + 0,5 » | | |
| 12. | 0,2 » | + 0,3 » | + 0 » | + 0,7 » | | |

| | Extrakt | Rinderserum | | | Na Cl-Lösg. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 13. | 0,2 ccm | + 0,25 ccm | $^1/_2$ Std. | 60° | + 0,45 ccm | Es erfolgte keine Präzipitation. |
| 14. | 0,2 » | + 0,5 » | | | + 0,2 » | |
| 15. | 0,2 » | + 0,7 » | | | | |

II. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum a 3 ccm akt. Rinderser. + 1,5 ccm Extrakt<br>» b 3 » + 2 Agarkultur Cholera in 1,5 ccm Na Cl-Lösg.<br>» c 3 ccm akt. Rinders. + 1,5 » | In a erfolgt starke Präzipitation, in b immer erneute Agglutination. |

Die über Nacht kühl gehaltenen Proben werden zentrifugiert und zu folgendem Versuche verwendet:

| | Extrakt | Serum c | Na Cl-Lös. | Rinderser. | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm | + 0,3 ccm | + 0,7 ccm | | |
| 2. | 0,2 › | + 0,3 › | + 0,4 › | + 0,3 ccm | ½ St. 61° |
| 3. | 0,2 › | + 0,3 › | + 0 › | + 0,7 › | |

Die Präzipitation ist nach 4 Std. bei 37° vollständig beendet.

| | Extrakt | Serum a | Na Cl-Lös. | Rinderserum | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4. | 0,2 ccm | + 0,3 ccm | + 0,7 ccm | | |
| 5. | 0,2 › | + 0,3 › | + 0,4 › | + 0,3 ccm | ½ St. 61° |
| 6. | 0,2 › | + 0,3 › | + 0 › | + 0,7 › | |

Nach 4 u. 6 St. bei 37° sind 4 u. 5 absolut klar und bleiben so. In 6 tritt nach 4 St. eine leichte, nach 6 St. eine etwas stärkere Trübg. auf, die nicht z. Flockenbildung führt. Üb. Nacht bildet sich ein geringer Satz.

| | Extrakt | Serum b | Na Cl-Lös. | Rinderserum | |
|---|---|---|---|---|---|
| 7. | 0,2 ccm | + 0,3 ccm | + 0,7 ccm | | |
| 8. | 0,2 › | + 0,3 › | + 0,4 › | + 0,3 ccm | ½ St. 61° |
| 9. | 0,2 › | + 0,3 › | + 0 › | + 0,7 › | |

Nr. 7 ist nach 4 Std. klar oder spurenweise trüb, n. 6 St. leicht ab. deutl. trüb, über Nacht bildet sich ein minimaler Satz. 8 u. 9 zeigen nach 4 St. beginn. Flockenbildg., die in typischer Weise zu Ende geht.

| | Extrakt | Serum a | Na Cl-Lös. | Rinderserum | |
|---|---|---|---|---|---|
| 10. | 0,2 ccm | + 0,6 ccm | + 0,7 ccm | | |
| 11. | 0,2 › | + 0,6 › | + 0,4 › | + 0,3 ccm | ½ St. 61° |
| 12. | 0,2 › | + 0,6 › | + 0 › | + 0,7 › | |

Die Prob. 10 u. 11 bleib. dauernd unveränd., 12 ist nach 4 u. 6 St. trüb. Flockenbildung wurde nicht beobachtet, über Nacht bildete sich ein geringer Satz.

| | Extrakt | Serum b | Na Cl-Lös. | Rinderserum | |
|---|---|---|---|---|---|
| 13. | 0,2 ccm | + 0,6 ccm | + 0,7 ccm | | |
| 14. | 0,2 › | + 0,6 › | + 0,4 › | + 0,3 ccm | ½ St. 61° |
| 15. | 0,2 › | + 0,6 › | + 0 › | + 0,7 › | |
| 16 | 0,2 › | Extrakt + 0,7 ccm Rinderser. | | | ½ St. 61° |

Nach 4 St. war Nr. 13 klar, nach 6 St. spurenweise trüb, üb. Nacht bildete sich ein minim. Satz. Die Prob. 14 u. 15 waren nach 4 St. in voll. Ausflockg. begriff., die n. 6 St. fast beend. war. 16 zeigte keine Präzipit.

III. Es werden hergestellt:

Serum a 3 ccm akt. Rinderser. + 0,75 ccm Extrakt + 0,75 ccm Na Cl-Lösung
Serum b 3 ccm akt. Rinderser. + 1,5 ccm Extrakt + 0 ccm Na Cl-Lösung
Serum c 3 ccm akt. Rinderser. + 2 Agarkultur Cholera in 1,5 ccm Na Cl-Lös.
Serum d 3 ccm akt. Rinderser. + 1,5 ccm Na Cl-Lös.

Die Proben a und b zeigen rasch Trübg., die zur völl. Ausflockung führt. In der Probe c erfolgt rasch Agglutination, die nach energ. Zerschütteln immer wiederkehrt. Nach kühler Auf-

bewahrung über Nacht werden die Sera zentrifugiert und zu folgendem Versuche verwendet:

| | Extrakt | Serum a | Rinderserum | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | + 0,45 ccm | | | Die Proben bleiben unverändert. |
| 2. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,3 ccm | $^1/_2$ St. 61—62° | |
| 3. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,9 » | | |
| 4. | 0,25 » | + 0,45 » | + 1,5 » | | |
| | **Extrakt** | **Serum b** | **Rinderserum** | | |
| 5. | 0,25 ccm | + 0,45 ccm | | | Die Proben bleiben bis auf eine zweifelhafte Trübung in 8 unverändert. |
| 6. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,3 ccm | $^1/_2$ St. 61—62° | |
| 7. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,9 » | | |
| 8. | 0,25 » | + 0,45 » | + 1,5 » | | |
| | **Extrakt** | **Serum c** | **Rinderserum** | | |
| 9. | 0,25 ccm | + 0,45 ccm | | | Nr. 9 u. 10 bleiben unverändert, zeigen am nächsten Tage schwach. Vibrionenwachstum, aber keine Präzipitation. In 11 u. 12 erfolgt Trübg. u. n. 6 St. Flockenbg. |
| 10. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,3 ccm | $^1/_2$ St. 61—62° | |
| 11. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,9 » | | |
| 12. | 0,25 » | + 0,45 » | + 1,5 » | | |
| | **Extrakt** | **Serum d** | **Rinderserum** | | |
| 13. | 0,25 ccm | + 0,45 ccm | | | In kurzer Zeit typische Präzipitation. |
| 14. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,3 ccm | $^1/_2$ St. 61—62° | |
| 15. | 0,25 » | + 0,45 » | + 0,9 » | | |
| 16. | 0,25 » | + 0,45 » | + 1,5 » | | |

17. 0,25 ccm Extr. + 1,5 ccm Rinderser. $^1/_2$ St. 61—62° bleibt unverändert.

An die Mitteilung dieser Versuchsbeispiele seien zunächst einige Bemerkungen angeknüpft. Es unterliegt keinem Zweifel, dafs Behandlung eines Rinderserums mit lebenden Vibrionen die präzipitierende Serumwirkung höchst ungünstig beeinflufst und ein Vergleich ergibt, dafs 1,5 ccm Choleraextrakt im zweiten Beispiel, 0,75 ccm im dritten ungefähr die gleiche Wirkung ausübt, wie zwei Schrägagarkulturen der Vibrionen. Natürlich haben solche Vergleiche nur einen sehr beschränkten und relativen Wert, da weder zwei Sera einander vollkommen gleich sind, noch zwei Extrakte absolut gleichmäfsig hergestellt werden können. Man kann also ohne eigens darauf gerichtete genaue Untersuchung nicht etwa die Vernichtung der Präzipitationskraft eines Serums als Mafsstab für die Konzentration eines Extraktes an gelöster Bakteriensubstanz benutzen und sagen, weil z. B. 1 ccm Extrakt die gleiche Wirkung habe wie eine Agarkultur, so müsse diese Bakterienmenge ebensoviel gelöste Substanz abgeben können, als 1 ccm Extrakt enthalte.

Denn die schädigende Wirkung morphologisch erhaltener lebender Vibrionen auf die Präzipitationswirkung des Rinderserums ist unter der Annahme besonderer Präzipitine nicht ohne weiteres zu verstehen. Sind Präzipitine als eigene Stoffe überhaupt vorhanden, so können sie sich nur gegen gelöste Substanz richten, denn für die morphologisch bestimmte sind Agglutinine und Bakteriolysine eingerichtet. Die Tatsache, dafs gelöste Bakteriensubstanz der Extrakte diese beiden Serumreaktionen verhindern kann, haben Neifser und Shiga durch die Annahme eines Mitteldinges zwischen gelösten und morphologisch determinierten Bazillenstoffen, den freien Rezeptoren, zu erklären gesucht. Dafs diese Annahme mit den Versuchsresultaten nicht in Einklang zu bringen ist, haben Weil für die Agglutination, Bail und Kikuchi für die im Reagenzglase, Weil und Axamit für die im Tierkörper stattfindende Bakteriolyse nachgewiesen, und es bleibt ein Rätsel, wieso Bakterienextrakte die Agglutination hemmen, für die doch ein besonderes Komplement nicht nötig sein soll, wenn man sich schon die Verhinderung der Bakteriolyse durch die auch nichts weniger als durchsichtige Komplementbindung zu erklären versucht.

Wieso erhaltene Vibrionen die Präzipitationswirkung beeinflussen können, bleibt völlig unverständlich, wenn Präzipitine, Agglutinine und Bakteriolysine als Stoffe sui generis im Serum vorhanden sind. Auch hier an freie Rezeptoren zu denken, ist wohl ganz unmöglich. Am nächsten läge eine Erklärung, welche ein allmähliches Inkrafttreten der verschiedenen Serumstoffe annehmen würde: die Bakteriolyse bringt Cholerasubstanz in Lösung und diese wird dann durch die Präzipitine, die dabei verbraucht werden, ausgefällt. Damit würde auch die Tatsache erklärt, dafs Rinderserum gar nicht oder nur schwer fällbare Choleraextrakte gibt, da die während der Extraktion durch Bakteriolyse oder sonstwie in Lösung gehende Bazillensubstanz durch Präzipitation sofort unlöslich und mit den Vibrionenresten durch Zentrifugieren entfernt wird. Auch die Paltaufsche Agglutinationstheorie, die namentlich von Kraus und Joachim[1]) und Porges[2])

1) Zentralbl. f. Bakt., Bd. 37. Nr. 1. 2) Zentralbl. f. Bakt., Bd. 40. Nr. 1.

verteidigt wird, überdies aber in den Versuchen von **Wassermann**[1]) über den engeren Zusammenhang zwischen Agglutination und Präzipitation eine Stütze findet, könnte zur Erklärung herangezogen werden. Eine andere Erklärung wird später versucht werden.

Quantitative Versuche lehrten, dafs schon verhältnismäfsig geringe Bakterienmengen einen deutlichen Einflufs auf die Präzipitationskraft eines Serums haben können.

I. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum a: 4 ccm akt. Rinderser. + $^{4}/_{100}$ Kultur Chol. | Zur Herstellung der Proben wurde 1 Schrägargarkultur in 1 ccm Serum aufgeschwemmt und durch Mischung von 0,04 + 0,96 reinen Serums die Probe a, ähnlich b u. s. f. hergestellt. Nach 2 std. Aufenthalt bei 37°, unter immer erneuter Agglutination, wurden die Proben zentrifugiert und |
| Serum b: 4 ccm akt. Rinderser. + $^{4}/_{10}$ Kultur Chol. | |
| Serum c: 4 ccm akt. Rinderser. + $^{4}/_{2}$ Kultur Chol. | |
| Serum d: 4 ccm akt. Rinderser. + 0 Kultur Chol. | |

die klaren Sera verwendet:

| | |
|---|---|
| 1. 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Serum a | Nach 6 St. Beobachtg. bei 37° ist in 1 u. 2 vollständ. Präzipit. eingetreten, 3 ist ganz leicht trüb, 4 unverändert. Über Nacht scheidet sich in 3 ein minimaler Satz aus. |
| 2. 0,5 » + 0,25 » | |
| 3. 0,5 » + 0,1 » | |
| 4. 0,5 » + 0,02 » | |

| | |
|---|---|
| 5. 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Serum b | Nach 6 Std. ist in 5 starke, in 6 unvergleichlich schwäch. Ausflockung im Gange, 7 u. 8 sind unverändert. Über Nacht bild. sich in 5 u. 6 Niederschläge, die viel geringer sind als in 1 und 2. 7 u. 8 zeigen keine Reaktion. |
| 6. 0,5 » + 0,25 » | |
| 7. 0,5 » + 0,1 » | |
| 8. 0,5 » + 0,02 » | |

| | |
|---|---|
| 9. 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Serum c | Erst nach 6 Std. ist in 9 eine leichte Trübung entstanden, die über Nacht einen minimal. Niederschlag liefert. Die Prob. 10—12 zeigen keine Reakt. |
| 10. 0,5 » + 0,25 » | |
| 11. 0,5 » + 0,1 » | |
| 12. 0,5 » + 0,02 » | |

| | |
|---|---|
| 13. 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Serum d | Typische Präzipitation, in 16 nur sehr gering. |
| 14. 0,5 » + 0,25 » | |
| 15. 0,5 » + 0,1 » | |
| 16. 0,5 » + 0,02 » | |

1) Zeitschrift f. Hygiene 1903.

II. Es werden hergestellt:

| | akt. Rinderser. | Agarkultur Chol. |
|---|---|---|
| Serum a | 8 ccm | + $^{8}/_{10}$ |
| » b | 8 » | + $^{8}/_{4}$ |
| » c | 8 » | + $^{8}/_{2}$ |
| » d | 8 » | + 0 |

Wie immer beständige Agglutination, während $^{1}/_{2}$ stündigen Aufenthalts bei 37°. Die abzentrifugierten Sera werden

zu folgendem Versuche verwendet:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,5 ccm Extrakt | + 0,5 ccm Serum a | Nach 1 Std. bei 37° ist in 1 u. 2 weit vorgeschritt., in 3 u. 4 beginn. Ausflockg. eingetreten, 5? Nach 3 Std. ist die Reakt. in 1 u. 2 beend., 3 ist fast beend., in 4 ist erst nach 6 Std. Satz gebild., 5 bleibt unveränd. u. lief. kein. Niederschlag. |
| 2. | 0,5 » | + 0,25 » | |
| 3. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 4. | 0,5 » | + 0,05 » | |
| 5. | 0,5 » | + 0,02 » | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6. | 0,5 ccm Extrakt | + 0,5 ccm Serum b | Nach 1 Std. zeigt 6 beginn. feinste Flockenbildg., 2 ist trüb, die übrig. Prob. sind unveränd. Nach 3 Std. sind 6 u. 7 voll von sich absetzend. Flocken, in 8 beginnt d. Ausflockg., 9 u. 10 sind und bleiben unveränd. |
| 7. | 0,5 » | + 0,25 » | |
| 8. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 9. | 0,5 » | + 0,05 » | |
| 10. | 0,5 » | + 0,02 » | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 11. | 0,5 ccm Extrakt | + 0,5 ccm Serum c | Nach 1 Std. ist nirgends Reakt. eingetreten. Nach 3 Std. tritt in 11 u. 12 Trübg. und beginn. Ausflockg. ein, die nach 6 Std. vollend ist. 13 zeigt erst nach 6 Std. schwache Flockenbildg., die übrig. bleiben unveränd. |
| 12. | 0,5 » | + 0,25 » | |
| 13. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 14. | 0,5 » | + 0,05 » | |
| 15. | 0.5 » | + 0,02 » | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 16. | 0,5 ccm Extrakt | + 0,5 ccm Serum d | Schon nach 1 Std. ist überall Ausflockg. von entsprech. Stärke in voll. Gange und führt bald zur Vollendg. der Reaktion. Die schliefsl. gebild. Sätze sind durchaus entsprech. stärk. als die durch d. Sera a—c erzeugten. |
| 17. | 0,5 » | + 0,25 » | |
| 18. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 19. | 0,5 » | + 0,05 » | |
| 20. | 0,5 » | + 0,02 » | |

III. Es werden hergestellt:

| | akt. Rinderserum | Agarkultur Chol. |
|---|---|---|
| Serum a | 8 ccm | + 1 |
| » b | 8 » | + 2 |
| » c | 8 » | + 4 |
| » d | 8 » | + 0 |

2 Std. bei 37° unter Agglutination, dann zentrifugiert und die Sera verwendet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,5 ccm Extrakt | + 1 ccm Serum a | Nach 6 Std. ist die Reaktion in 1 und 2 fast vollendet, in 3 und 4 Trübung, die zur Bildung sehr geringer Sätze führt. |
| 2. | 0,5 » | + 0,5 » | |
| 3. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 4. | 0,5 » | + 0,05 » | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 5. | 0,5 ccm Extrakt | + 1 ccm Serum b | Nach 6 Std. ist eine wesentl. gering. Ausflockg. in 5 u. 6 als in d. entsprech. Proben d. Serums a eingetreten, 7 ist leicht trüb und liefert einen gering. Satz, 8 bleibt reaktionslos. |
| 6. | 0,5 » | + 0,5 » | |
| 7. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 8. | 0,5 » | + 0,05 » | |
| 9. | 0,5 ccm Extrakt | + 1 ccm Serum c | Während 6 Std. flockt nur Nr. 9 schwach aus, Nr. 10 wird spurenweise trüb und liefert ein. minim. Satz, 11 u. 12 geben keine Präzipit. |
| 10. | 0,5 » | + 0,5 » | |
| 11. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 12. | 0,5 » | + 0,05 » | |
| 13. | 0,5 ccm Extrakt | + 1 ccm Serum d | Typ. Reaktion nach 2 Std. überall beend. Die Sätze nehmen an Stärke von 13 nach 16 zu ab, sind aber überall stärker als d. entsprech. Sera a, b, c. |
| 14. | 0,5 » | + 0,5 » | |
| 15. | 0,5 » | + 0,1 » | |
| 16. | 0,5 » | + 0,05 » | |

## Die Bakteriolyse von Choleravibrionen durch Rinderserum.

Unter Bakteriolyse versteht man eine Schädigung und Abtötung von Bakterien durch tierische Flüssigkeit, welche morphologisch, namentlich bei Vibrionen, mit eingreifenden Gestaltsveränderungen verbunden ist. Während bei der Präzipitation eine rein chemische oder physikalisch-chemische Zustandsänderung einer leblosen, gelösten Substanz erfolgt, ist bei der Bakteriolyse sowohl ein physiologisches als ein chemisches oder physikalisch-chemisches Geschehen da.

Statt Bakteriolyse gebrauchte man früher den Ausdruck Bakterizidie, mit dem nur das physiologische Ergebnis der Serumaktivität, das Absterben oder die Entwicklungshemmung von Bakterien gekennzeichnet wurde. In diesem Sinne ist der Ausdruck Bakteriolyse besser, der die Zustandsänderung der Vibrionen in den Vordergrund stellt. Aber streng genommen führt auch er irre, wenn man ihn allzu wörtlich nimmt. Denn für das Zustandekommen dieser Form der Serumaktivität hat man zwei Kennzeichen zur Verfügung: 1. den kulturellen Plattenversuch, der den physiologischen Effekt, die Bakterienabtötung anzeigt, 2. die mikroskopische Untersuchung, welche die Form und Zustandsänderung der Bakterien verrät. Diese bestehen bei den Vibrionen in jener seit Pfeiffers ersten Untersuchungen oft beschriebenen Körnchenbildung, die oft, aber durchaus nicht notwendig mit dem Tode der Vibrionen zusammenfällt. Wenn

aber das, was man Bakteriolyse, offenbar in Anlehnung an das Wort Hämolyse nennt, als wirkliche Auflösung des Vibrio gemeint sein soll, so trifft dies für Reagenzglasversuche wenigstens nicht zu. Metschnikoff hat mit allem Nachdruck betont, dafs die Serenwirkung über Granulabildung nie hinausgeht und auch für den Effekt des Rinderserums gilt das Gleiche. Das kann man sowohl im hängenden Tropfen als auch bei Versuchen gröfseren Mafsstabes beobachten, wenn man eine ansehnliche Zahl Vibrionen in viel Serum einträgt, bei 37 oder 42° einige Zeit beläfst und dann zentrifugiert. Es entsteht immer ein Bodensatz aus Körnchen und Detritus, der an Menge sicher nicht geringer ist als das Quantum der eingesäten Vibrionen. Dafs nichts, was durch Präzipitation nachweisbar wäre, in Lösung übergeht, zeigt die schlechte Eignung des Serums zur Herstellung von Extrakten zur Genüge. Höchstens um eine primäre Lösung mit sekundärer Wiederausfällung in dem auf S. 349 erwähnten Sinne könnte es sich handeln.

Die blofse Granulabildung kann nicht als Auflösung, bestenfalls nur als Gestaltsänderung mit Volumsverminderung (aber auch diese kann oft zweifelhaft sein) bezeichnet werden. Man hat durchaus kein Recht, die Bakteriolyse in bezug auf die Gestalts- und Zustandsänderung mit der Hämolyse in enge Verbindung zu setzen und hat volle Freiheit, die Granulabildung in eigener Weise zu deuten. Auf den weiteren Gebrauch des Wortes Bakteriolyse braucht man deswegen natürlich nicht zu verzichten. Die Technik der Versuche war die im Institute übliche, bei welcher der ganze Inhalt der 4 Stdn. bei 37° gehaltenen Versuchsprobe zur Platte verarbeitet wurde. Abweichungen davon sind besonders angeführt.

Die Bakteriolyse findet ähnlich wie Agglutination und Präzipitation durch Rinderserum schon bei niederer Temperatur (6—10°) statt und verläuft bei gewöhnlicher Zimmertemperatur rasch genug und läfst sich durch mikroskopische und Plattenuntersuchung leicht demonstrieren. Die übliche Versuchstemperatur von 37° beschleunigt die Reaktion in jeder Hinsicht, stellt aber noch nicht ihr Optimum dar, da bei 42° die Bakterio-

lyse noch schneller und intensiver verläuft; bei 44° verhält es sich ähnlich, aber bei dieser Temperatur findet schon an sich eine mikroskopisch leicht erkennbare, der Granulabildung oft sehr ähnliche Vibrionenschädigung statt, so dafs eine Feststellung des Anteils der Bakteriolyse an der Keimverminderung unsicher wird. Der Umstand, dafs man bei längerer Einwirkung von 44° auf in Wasser oder Kochsalzlösung aufgeschwemmte Vibrionen bereits fällbare Extrakte erhalten kann, deutet schon allein auf den zerstörenden Einflufs dieser Wärme hin.

Von einigem Interesse ist eine Beobachtung, die noch genauerer, zurzeit durch Tiermangel unmöglich gemachter eigener Untersuchungen bedarf, aber was das Prinzip betrifft, sicher sein dürfte. Sie wurde gemacht bei Untersuchung der Frage, ob bei der Bakteriolyse giftige Stoffe in das Serum übergehen. Das ist nicht der Fall, selbst bei $^1/_4$ und $^1/_2$ Agarkultur nicht. Aber auch wenn eine ganze Agarkultur mit Hilfe von 4 ccm Serum bei 42° aufgelöst wird, also eine Menge von Vibrionen, die schon an sich im abgetöteten Zustande schwere Krankheitszustände und oft Tod herbeiführte, blieb jede stärkere Vergiftung aus. Nun sind aber 4 ccm aktiven Rinderserums schon an sich für kleine Meerschweinchen immer, für grofse meist tödlich, so dafs hier das Aufeinanderwirken zweier hochgiftiger Stoffe eine relativ unschädliche Flüssigkeit ergibt. Die Versuche sind für die Beurteilung des bei der Bakteriolyse freiwerdenden Giftes, das man annimmt, nicht bedeutungslos und verdienen eine Fortsetzung.

Die starke Bakteriolyse des Rinderserums gilt nicht nur den Choleravibrionen allein, auch gegen die benutzten Stämme von Staphylokokken und Typhus erwies es sich höchst wirksam und auch der sonst überall widerstandsfähige Hühnercholerabazillus erfuhr in Versuchen von Weil eine starke Schädigung. Nur gegen den verwendeten Stamm von Milzbrand versagte es. Durch Behandlung eines Rinderserums mit Typhusbazillen kann man die Bakteriolyse von Choleravibrionen aufheben oder abschwächen und umgekehrt.

Die bakteriolytischen Versuche, die angestellt wurden, sind fast ausschliefslich Plattenversuche, beziehen sich also auf die physiologische Seite der Serumwirkung. Verwendet wurden ganz junge Agar- oder Bouillonkulturen (12 bis höchstens 16 Stdn. alt), die meist in sehr grofser Menge zur Einsaat gelangten.

Wie bereits erwähnt, ist die bakterizide Kraft des Rinderserums aufserordentlich hoch und ist, so weit eigene Erfahrungen reichen, nur mit der von spezifischen Immunseren zu vergleichen. Dabei ist sie sehr regelmäfsig vorhanden und nur sehr selten wurde ein Serum gefunden, das schwach wirkte. Sie tritt nicht nur im Reagenzglase, sondern auch im Tierkörper hervor, wo der Pfeiffersche Versuch in der Meerschweinchenbauchhöhle mit Leichtigkeit ausgelöst werden kann.[1])

Für Reagenzglasversuche kann man die absolute Kraft der Bakteriolyse in zweifacher Weise zu bestimmen versuchen; entweder, indem man feststellt, welche kleinste Menge aktiven Serums gerade noch genügt, um eine bestimmte Menge Vibrionen ganz oder fast ganz abzutöten oder indem man untersucht, wieviel Cholerakultur durch eine bestimmte Menge Rinderserums noch abgetötet werden kann. Beide Methoden ergeben sehr hohe Werte, die natürlich für verschiedene Seren nicht vollkommen gleich sind.

**Ia.** Verwendet wird eine Aufschwemmung von 1 Agarkultur Cholera in 20 ccm NaCl-Lösung.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 ccm Aufschwemmung + | 10, | 5, | 2,5 | 1, | 0,5 | 0,1 ccm aktives Rinderserum |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 212. |

Das gleiche Serum, 1/2 Std. auf 56° erhitzt, ergab überall starkes Wachstum.

**Ib.** Es werden bei schnellstmöglichem Arbeiten Aufschwemmungen von Vibrionen in demselben aktiven Rinderserum wie bei Ia hergestellt: I. 1 Agarkultur in 0,5 ccm Serum. II. 0,05 ccm der Aufschwemmung I + 0,9 ccm Serum. III. 0,1 ccm Aufschwemmung II + 0,95 ccm Serum.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,02 ccm der Aufschwemmung | III + 0,98 ccm aktives Serum | 0 |
| 2. | 0,05 » » » | III + 0,95 » » » | 0 |
| 3. | 0,1 » » » | III + 0,9 » » » | 0 |
| 4. | 0,02 » » » | II + 0,98 » » » | 0 |
| 5. | 0,1 » » » | II + 0,9 » » » | 0 |
| 6. | 0,5 » » » | II + 0,5 » » » | ca. 4000 |
| 7. | 0,05 » » » | I + 0,95 » » » | » 6000 |

1) Weil, dies. Archiv, Bd. 61.

IIa. Verwendet wird eine Aufschwemmung von 1 Agarkultur Cholera in 20 ccm NaCl-Lösung.

1 ccm Aufschwemmung + 5, 2,5, 1, 0,5, 0,2, 01 ccm akt. Rinderserum
0 0 1920 1232 2800 über 10000.

Das auf 56° erhitzte Serum läfst überall Wachstum zu.

IIb. Zu diesem Versuche wird die gleichbleibende Menge von nur 0,2 ccm Serum verwendet, das nach völliger Herstellung der Proben auf 1 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt ist.

Es trat vollständige Abtötung bei Zusatz von $^1/_{10000}$, $^1/_{5000}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{500}$ u. $^1/_{100}$ Kultur ein.

Weitere Beispiele werden gleichzeitig mit anderen Versuchen mitgeteilt.

Wie die gröfste Mehrzahl der überhaupt bakteriolytisch wirksamen Seren, wird auch das Rinderserum durch $^1/_2$ stündige Erhitzung auf 56° unwirksam gemacht, inaktiviert und zwar so regelmäfsig, dafs man die Temperatur von 56° mit Recht als absolute Inaktivierungstemperatur betrachten kann. Nur ganz selten zeigten so erhitzte Sera noch eine ganz geringe Bakteriolyse oder vielmehr eine schwache Entwicklungshemmung. Dennoch dürfte wahrscheinlich auch hier, wie bei Agglutination und Präzipitation auch nur eine Relativität der Hitzeinaktivierbarkeit bestehen. Denn es handelt sich bei Plattenversuchen um den Effekt, den das Serum auf das Leben von Bakterien ausübt: man kann nur feststellen, ob und wie viele Bakterien nach einiger Zeit zugrunde gegangen sind, nicht aber, ob inzwischen eine Schädigung stattgefunden hat, welche durch das Leben derselben schliefslich überwunden wurde. Es ist ja, namentlich wieder durch Metschnikoff, aber auch durch zahlreiche andere Beobachtungen bekannt, dafs selbst in Granula verwandelte Vibrionen noch lebensfähig sein können, und die Verfasser waren oft sehr überrascht, zu sehen, wie aus Flüssigkeiten, die nach dem mikroskopischen Bilde nur Körnchen, aber keine Vibrionen mehr enthielten, noch sehr viele Kolonien auf der Platte aufgingen. Eine nur morphologisch erkennbare Schädigung zeigt die mikroskopische Beobachtung natürlich allein an, und man kann sehr regelmäfsig beobachten, dafs in einem $^1/_2$ Stde. auf 56° erhitzten Serum eingebrachte Vibrionen immer teilweise, oft aber sehr starke „bakteriolytische Veränderungen“ bis zur Granulabildung durchzumachen haben, ehe der hängende Tropfen

nur von normalen Vibrionen erfüllt ist. Dazu kommt, dafs auch in einem auf 56° erhitzten Serum das Wachstum noch durch Mittel, welche erfahrungsgemäfs die Bakteriolyse hemmen, ganz aufserordentlich begünstigt wird. Ein solches Mittel ist der Choleraextrakt (vgl. später S. 367 ff.).

Einsaat: 3100 Vibrionen. Der Inhalt der Proberöhrchen wird schon nach 3 Std. Aufenthalt bei 37° mit Agar vermischt und zur Platte ausgegossen.

| | akt. Rinderserum | | NaCl-Lösung | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,75 ccm | | + 0,25 ccm | | 0 |
| | Rinderserum | | | Extrakt | |
| 2. | 0,75 » | 1/2 Std. 56° | + 0,25 ccm | | ca. 12000 |
| 3. | 0,75 » | » | + 0,24 » | + 0,0001 ccm | ca. 12000 |
| 4. | 0,75 » | » | + 0,23 » | + 0,0002 » | ca. 12000 |
| 5. | 0,75 » | » | + 0,15 » | + 0,001 » | über 20000 |
| 6. | 0,75 » | » | + 0,23 » | + 0,002 » | über 25000 |
| 7. | 0,75 » | » | + 0,15 » | + 0,01 » | ∞ |
| 8. | 0,75 » | » | + 0,23 » | + 0,02 » | ∞ |
| 9. | 0,75 » | » | + 0,15 » | + 0,1 » | ∞ |

Das aktive Rinderserum wurde in der Menge von 0,75 ccm erst durch 0,25 ccm Extrakt deutlich gehemmt, in der Menge von 0,2 ccm durch 0,1 ccm.

Gegen solche Versuche kann allerdings der Einwand gemacht und schwer widerlegt werden, dafs der Zusatz von Choleraextrakt gleichbedeutend mit dem Zusatze eines Nährstoffes sei, welcher als solcher die zurückbleibenden Spuren von bakterizider Serumwirkung nicht mehr zur Geltung kommen läfst. Versuche, welche ergaben, dafs bei Verwendung eines auf 56° erhitzten Serums innerhalb kurzer Zeit (1/2—1 Stde.) eine sehr deutliche Keimabnahme durch Plattenzählung festzustellen ist, sollen nicht erst mitgeteilt werden, da gegen sie der berechtigte, auf Baumgartens, Walz und Fischers Untersuchungen zurückgehende Einwand anwendbar ist, dafs rein infolge Wechsels des Mediums auch in Kochsalzlösung, Peptonwasser und selbst Bouillon eine Keimverminderung in der ersten Zeit erfolgt. Bis auf weiteres kann die Hitze von 56° also als absolute Inaktivierungstemperatur für die Bakteriolyse von Choleravibrionen im normalen Rinderserum angesehen werden.

Unterhalb derselben kann man aber die Relativität der Inaktivierung von Rinderserum unschwer nachweisen. Das äufsert

sich so, dafs ein erwärmtes Serum eine bestimmte Menge von Vibrionen erst in erheblich gröfserer Menge abtötet als ein aktives. Die verschiedenen Sera verhalten sich im Detail nicht gleich und allzuviel wurden nicht untersucht (3 mit zwei, 2 mit einer Inaktivierungstemperatur durch $^1/_2$ Std.). Denn die wesentlichste Versuchsbedingung, die absolute genaue Einhaltung einer bestimmten Temperatur während längerer Zeit, gleichzeitig für mehrere verschieden hoch zu erwärmende Proben, vermag nur ein ziemlich luxuriös ausgestattetes Institut durchzuführen, das leider eben nicht zur Verfügung stand. Doch dürften die erhaltenen Resultate ausreichen. Im allgemeinen schadet die halbstündige Einwirkung von 49 und 50° noch nichts, aber über diese Temperatur hinaus vermag man bereits eine mehr minder deutliche Abschwächung der bakteriziden Serumwirkung festzustellen.

I. Zur Einsaat wird 0,05 und 0,1 ccm Bouillonkultur verwendet. Von einem Auffüllen der Proben auf gleiches Volumen wurde abgesehen.

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | aktives Rinderserum | | | | |
| 0,05 ccm | | + | 5 | 3 | 2 | 1 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | ccm |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ca. 1000 | ca. 7000 | |
| | | | | | | | Rinderserum $^1/_2$ Std. 53° | | | | |
| 0,05 » | Bouillonkultur | + | 5 | 3 | 2 | 1 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | » |
| | | | 0 | 0 | 19 | 13 | 2100 | 2900 | ca. 30 000 | ∞ | |
| | | | | | | | aktives Rinderserum | | | | |
| 0,1 » | | + | 5 | 3 | 2 | 1 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | » |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | ca. 3000 | ca. 9000 | |
| | | | | | | | Rinderserum $^1/_2$ Std. 53° | | | | |
| 0,1 » | | + | 5 | 3 | 2 | 1 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | » |
| | | | 17 | 12 | 62 | 428 | ca 7000 | ca. 20 000 | ca. 25 000 | ∞ | |

II. Zur Einsaat wird eine Kochsalzaufschwemmung von 1 Kultur Cholera in 1,5 ccm NaCl-Lösung verwendet.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | aktives Rinderserum | | | |
| 0,05 ccm | | + | 2,5 | 1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | ccm |
| | | | 0 | 0 | 0 | 3200 | ca. 20 000 | |
| | | | | | Rinderserum $^1/_2$ Std. 52° | | | |
| 0,05 » | Aufschwemmung | + | 2,5 | 1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | » |
| | | | 0 | 82 | ca. 1000 | ∞ | ∞ | |
| | | | | | Rinderserum $^1/_2$ Std. 54° | | | |
| 0,05 » | | + | 2,5 | 1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | » |
| | | | 12 | ca. 3000 | ca. 80 000 | ∞ | ∞ | |

III. Zur Einsaat wird eine Aufschwemmung in 20 ccm NaCl-Lösung verwendet.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | aktives Rinderserum | | | | | | |
| 1 ccm Aufschwemmung | + 10 | 5 | 2,5 | 1 | 0,5 | 0,1 | ccm |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 212 | |
| | Rinderserum $^1/_2$ Std. 52° | | | | | | |
| 1 » | + 10 | 5 | 2,5 | 1 | 0,5 | 0,1 | » |
| | 0 | 0 | 0 | 1 | 598 | ca. 8000 | |
| | Rinderserum $^1/_2$ Std. $54^1/_2$—55° | | | | | | |
| 1 » | + 10 | 5 | 2,5 | 1 | 0,5 | 0,1 | » |
| | 43 | 29 | ca. 2000 | ca. 6000 | ca. 50 000 | ca. 200 000 | |

Für hämolytische Versuche ist die Relativität der Inaktivierungstemperatur seit längerer Zeit bekannt, und es sei nur auf die Versuche von Gay[1]), als das vielleicht auffallendste Beispiel, hingewiesen.

Wenn hier ein anscheinend nebensächlicher Umstand durch ausführlichere Behandlung hervorgehoben ist, so geschieht dies, um auf die prinzipielle Übereinstimmung des Verhaltens der drei bekannten Serumwirkungen auf Choleravibrionen und Cholerasubstanz aufmerksam zu machen. Für alle drei sind bestimmte Hitzegrade nur relativ inaktivierend, aber die Temperatur, die das bewirkt, steigt von der bakteriolytischen über die präzipitierende zur agglutinierenden Serumreaktion an. Das wird später wichtig werden.

Über Veränderungen der bakteriolytischen Fähigkeiten beim Älterwerden des Serums fehlen systematische Untersuchungen.

Ein Einflufs der Menge des Serums, wie er bei der Präzipitation (vgl. S. 341) manchmal festzustellen war, war für die Bakteriolyse nicht zu bemerken. Die Menge Vibrionen, die durch 0,1 ccm Serum vernichtet wurde, starb auch bei Verwendung von 10 ccm ab. Auch das bei 56° inaktivierte Serum vermochte keine wesentliche Abschwächung der Bakteriolyse, also keine Komplementablenkung herbeizuführen.

I. Einsaat 3—5000 Vibrionen aus Agarkultur in NaCl-Aufschwemmung (1 Tropfen).

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1. 0,1 ccm aktives Rinderserum | + 0,9 NaCl-Lösung | | | 0 |
| 2. 0,1 » | + 0,8 » | + 0,1 Rinderserum | $^1/_2$ Std. 56° | 0 |
| 3. 0,1 » | + 0,6 » | + 0,3 » | $^1/_2$ » 56° | 0 |
| 4. 0,1 » | + 0,4 » | + 0,5 » | $^1/_2$ » 56° | 0 |
| 5. 0,1 » | + 0 » | + 0,9 » | $^1/_2$ » 56° | 0 |

1) Zentralblatt für Bakteriologie Bd. 40, Nr. 5.

II. Einsaat 4—7000 Vibrionen aus Agarkultur in NaCl-Aufschwemmung (1 Tropfen).

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. 0,1 ccm | aktives Rinderserum | + 2,5 ccm NaCl-Lösung | | Rinderserum ½ Std. 56° | 0 |
| 2. 0,1 » | | + 2 » » | + 0,5 ccm | | 45 |
| 3. 0,1 » | | + 1,5 » » | + 1 » | | 202 |
| 4. 0,1 » | | + 1 » » | + 1,5 » | | 70 |
| 5. 0,1 » | | + 0,5 » » | + 2 » | | 469 |
| 6. 0,1 » | | + 0 » » | + 2,5 » | | 103 |
| 7. 0,1 » | | + 0 » » | + 5 » | | 9 |

III. Einsaat $^1/_{100}$ Agarkultur Cholera in 0,05 ccm NaCl-Lösung.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. 0,1 ccm | aktives Rinderserum | + 5 ccm NaCl-Lösung | | Serum ½ Std. 60° | 8 200 |
| 2. 0,1 » | | + 4 » » | + 1 ccm | | 12 300 |
| 3. 0,1 » | | + 3 » » | + 2 » | | 7 400 |
| 4 0,1 » | | + 2 » » | + 3 » | | 6 900 |
| 5. 0,1 » | | + 1 » » | + 4 » | | 10 300 |
| 6. 0,1 » | | + 0 » » | + 5 » | | 6 800 |

Auch wenn, wie im III. Versuchsbeispiel, die Bedingungen für Bakteriolyse schon sehr ungünstig gestaltet werden, kann man von einer Hemmung durch inaktives Serum nicht sprechen. Diese Versuche wurden in gröfserer Zahl und sorgfältig deshalb angestellt, weil viel dafür zu sprechen schien, dafs sich auch für die Hemmung der agglutinierenden, fällenden und bakteriolytischen Serumwirkung durch erwärmtes Serum eine ähnliche gesetzmäfsige Reihe ergeben müfste, wie sie bei der Inaktivierungstemperatur zweifellos besteht. Man würde danach die Agglutination schon durch relativ wenig, die Präzipitation nur durch sehr viel erhitztes Serum, die Bakteriolyse überhaupt nicht verhindern können. Es stellte sich aber später bei Versuchen, die zu anderem Zwecke gemacht waren, heraus, dafs eine Bakteriolysehemmung durch höher als 62—63° erhitztes Serum möglich ist, und dafs die Erwärmungstemperatur eines Serums auf dessen hemmende Wirkung für die Serumreaktionen von sehr grofsem Einflusse ist. Diese Frage hätte erst systematisch studiert werden müssen, was bisher nicht möglich war und nur für Agglutination hat Herr Dr. Braun erst einiges Material gesammelt. Die Frage mufs also vorläufig noch offen bleiben. Wie die agglutinierende und präzipitierende, so wird auch die bakterizide Wirkung des normalen Rinderserums durch vorher-

gehende Behandlung mit Choleravibrionen aufgehoben oder geschwächt. Um die Besprechung nicht allzusehr auszudehnen, sei bezüglich der Literatur des vielstudierten Themas der Serumbeeinflussung durch Bakterien auf die zusammenfassenden Handbücher verwiesen. Man kann die Serumbakteriolyse sowohl durch lebende wie durch abgetötete Vibrionen zum Verschwinden bringen; nur erstere wurden verwendet.

I. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Serum I 8 ccm aktives Serum + $^{8}/_{10}$ | Agarkultur Cholera | Nach $^{1}/_{2}$ Std. Aufenthalt bei 37° (Agglutination) werden die Proben abzentrifugiert und verwendet. |
| » II 8 » » » + 2 | | |
| » III 8 » » » + 4 | | |

Zur Einsaat gelangt 0,05 ccm einer Aufschwemmung von 1 Agarkultur in 1,5 ccm Na Cl-Lösung.

| | aktives Serum | Serum I | Serum II | Serum III |
|---|---|---|---|---|
| 2,5 ccm | 0 | 0 | 0 | ∞ |
| 1 » | 0 | 7 | ca. 10 000 | ∞ |
| 0,5 » | 0 | 224 | ∞ | ∞ |
| 0,2 » | 3200 | über 10 000 | ∞ | ∞ |
| 0,1 » | ca. 20 000 | ∞ | ∞ | ∞ |

II. Genau wie der unter I verzeichnete Versuch mit frischen Seren

| | aktives Serum | Serum I | Serum II | Serum III |
|---|---|---|---|---|
| 2,5 ccm | 0 | 0 | ca. 10 000 | ∞ |
| 1 » | 0 | 17 | ∞ | ∞ |
| 0,5 » | 0 | 512 | ∞ | ∞ |

III. Es werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum I 8 ccm aktives Serum + 1 Agarkultur | $^{1}/_{2}$ Std. 37°, dabei Agglutination. Zentrifugiert und verwendet. |
| » II 8 » » » + 2 » | |
| » III 8 » » » + 4 » | |

Einsaat 0,05 ccm einer Aufschwemmung von 1 Agarkultur in 1,5 ccm Na Cl Lösung.

| | aktives Serum | Serum I | Serum II | Serum III |
|---|---|---|---|---|
| 2 ccm | 0 | 92 | ∞ | ∞ |
| 1 » | 2 | 12 000 | ∞ | ∞ |
| 0,5 » | 2800 | ∞ | ∞ | ∞ |
| 0,1 » | 20 000 | ∞ | ∞ | ∞ |

Die Versuchsbeispiele, deren Vermehrung angesichts ihrer Unzweideutigkeit nicht nötig ist, sind klar. Sie betreffen Sera verschiedener Wirksamkeit und namentlich das Serum des mit III bezeichneten Versuches ist relativ schwach. Es mufs sofort auffallen, dafs dieses durch Vibrionen weit stärker als die

anderen beeinflufst erscheint, d. h., dafs die Bakteriolyseabschwächung um so leichter gelingt, je geringer die bakterizide Kraft von vornherein ist.[1]) Von der Richtigkeit dieses Satzes kann man sich sofort überzeugen, wenn man untersucht, wie sich das viel schwächere Kaninchenserum verhält, das bei viel kleinerer Einsaat — eine grofse ist überhaupt nicht anwendbar — schon durch relativ kleine Bakterienmengen unwirksam gemacht wird. Durch Zusatz von Immunserum zu Kaninchen- oder Rinderserum kann man sofort feststellen, wie die Bakteriolyse verloren geht.

I. Mit Kaninchenserum werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum I 2,5 ccm aktives Serum + $^{5}/_{20}$ Agarkultur (in 0,5 Na Cl-Lösung)<br>» II Wie I mit Zusatz von 0,0025 ccm Choleraimmunserum<br>» III Wie I mit Zusatz von 0,25 ccm Cholera-immunserum | $^{3}/_{4}$ Std. 37°. Dann zentrifugiert und ein Teil der klaren Flüssigkeit $^{1}/_{2}$ Std. auf 60° erhitzt |

| | | |
|---|---|---|
| 1. 0,64 Na Cl-Lösung + 0,36 ccm Serum I | ca. 20 000 | ∞ |
| 2. 0,54 » + 0,36 » » + 0,001 ccm Choleraimmunserum | | 6 |
| 3. 0,54 Na Cl-Lösung + 0,36 ccm Serum I + 0,01 ccm Choleraimmunserum | | 5 |
| 4. 0,54 Na Cl-Lösung + 0,36 ccm Serum I + 0,1 ccm Choleraimmunserum | | ca. 8000 |
| 5.–8. Wie 1—4 mit Serum I, das $^{1}/_{2}$ Std. auf 60° erhitzt war. | ca. 10 000 | über 50 000 |
| 9. Wie 1—4 mit Serum II | ca. 8000 | 150 000 |
| 10. | | 3 |
| 11. | | 0 |
| 12. | | ca. 10 000 |
| 13. Wie 1—4 mit Serum III. | ca. 10000 | 1 |
| 14. | | 0 |
| 15. | | 0 |
| 16. | | ca. 10 000 |
| 17. 0,7 Na Cl-Lösung + 0,3 ccm aktives Kaninchenserum | 5360 | 7800 |
| 18. 0,7 » + 0,3 » Kaninchenserum $^{1}/_{2}$ Std. 60° | 4864 | 50 000. |

Die erhitzte Hälfte der Sera II und III liefsen mit und ohne Immunserum Wachstum zu.

1) Vgl. dazu die Resultate von Bail (Archiv f. Hygiene Bd. 35), der, mit Kaninchenserum und abgetöteten Bakterien verschiedener Art arbeitend, zu dem Schlusse kam, dafs diejenigen Bakterien das Serum am stärksten beeinflussen, deren Widerstandskraft gegen Bakterizidie am gröfsten ist.

II. Rinderserum und Kaninchenserum werden mit den gleichen Bakterien in folgender Weise behandelt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Rinderserum | I | 4 ccm + 4/10 Agarkultur Cholera | |
| » | II | 4 » + 4/2 » » | |
| » | III | 4 » + 0 » » | |
| Kaninchenserum | I | 4 ccm + 4/20 Agarkultur Cholera | |
| » | II | 4 » + 4/10 » » | |
| » | III | 4 » + 0 » » | |

Einsaat überall zwischen 10—15000 Vibrionen aus einer Aufschwemmung von Agarkultur in Na Cl-Lösung.

| | | |
|---|---|---|
| 1. | 0,5 ccm Rinderserum I | 0 |
| 2. | 0,5 » » + 0,001 ccm Choleraimmunserum | 0 |
| 3. | 0,5 » » + 0,0005 » » | 0 |
| 4. | Wie 1—3 mit Rinderserum II | ca. 70000 |
| 5. | | 49 |
| 6. | | 2 |
| 7. | Wie 1—3 mit Rinderserum III | 0 |
| 8. | | 0 |
| 9. | | 0 |
| 10. | 0,5 ccm Kaninchenserum I | ∞ |
| 11. | 0,5 » » +0,001 ccm Choleraimmunserum | 630 |
| 12. | 0,5 » » +0,0005 » » | 608 |
| 13. | Wie 1—3 mit Kaninchenserum II | ∞ |
| 14. | | 40 |
| 15. | | 1288 |
| 16. | Wie 1—3 mit Kaninchenserum III | 7300 |
| 17. | | 0 |
| 18. | | 0 |

III. Mit Kaninchenserum werden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum I 2,5 ccm Serum + 5/30 Kultur Cholera + 0,05 ccm Na Cl-Lösung | Während 3/4 Std. Aufenthaltes bei 37° tritt in III und IV Agglutination ein, die aber nach Zerschütteln sich nur langsam erneut. Zentrifugiert und verwendet. |
| Serum II 2,5 ccm Serum + 5/30 Kultur Cholera + 0,0005 ccm Immunserum | |
| Serum III 2,5 ccm Serum + 5/30 Kultur Cholera + 0,005 ccm Immunserum | |
| Serum IV 2,5 ccm Serum + 5/30 Kultur Cholera + 0,05 ccm Immunserum | |

Einsaat ca. 12000 Vibrionen aus einer Aufschwemmung von Agarkultur in NaCl-Lösung.[1])

1) Bei diesen Versuchen ist zu berücksichtigen, dafs sich im zentrifugierten Serum lebende Vibrionen befinden, die nicht vernachlässigt werden dürfen. Es sind deshalb diese Versuche mit Ösenaussaat hergestellt und die Menge Vibrionen, welche eine Öse Serum zu Beginn des Versuches nach erfolgter Einsaat enthielt, wurde festgestellt. Sie betrug hier für die Sera I—IV: 15000, 2320, 1052, 952. Für Versuche mit Rinderserum sind solche Vorsichtsmafsregeln nicht so nötig.

| | Serum I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| 1. 0,3 ccm Serum + 0,7 ccm Na Cl-Lösung | ∞ | ca. 2000 | 980 | 850 |
| 2. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,001 ccm Choleraimmunserum | 112 | 314 | 532 | 0 |
| 3. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,01 ccm Choleraimmunserum | 4 | 17 | 0 | 8 |
| 4. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,1 ccm Choleraimmunserum | 210 | 60 | 0 | 0 |

Die andere Hälfte des Versuches, welche mit $^1/_2$ Std. auf 56—60° erhitztem Serum I—IV in gleicher Weise angestellt war, zeigte Wachstum ohne Hemmung. 0,3 ccm Normalserum tötete diesmal völlig ab.

IV. Mit Kaninchenserum werden hergestellt:

Serum I 2,4 ccm aktives Serum + $^3/_{20}$ ccm Kultur Cholera + 0,1 ccm inaktives Kaninchenserum.

Serum II 2,4 ccm aktives Serum + $^3/_{20}$ ccm Kultur Cholera + 0,1 ccm inaktives Choleraimmunserum von Kaninchen.

Serum III 2,4 ccm aktives Serum + $^3/_{20}$ ccm Kultur Cholera + 0,1 ccm inaktives Choleraimmunserum vom Pferde ›Edith‹.

Nach 1 Std. Aufenthalt bei 37° und Zentrifugieren erfolgt die Einsaat 18—20000 Vibrionen.[1])

| | Serum I | II | III |
|---|---|---|---|
| 1. 0,3 ccm Serum + 0,7 ccm Na Cl-Lösung | ∞ | 0 | 0 |
| 2. 0,3 › › + 0,6 › › + 0,001 ccm inakt. Choleraserum v. Kaninchen | 0 | 0 | 0 |
| 3. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,01 inakt. Choleraserum v. Kaninchen | 8 | 0 | 20 |
| 4. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,1 ccm inakt. Choleraserum v. Kaninchen | 4 | ca. 10000 | über 10000 |
| 5. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,001 ccm inakt. Choleraserum vom Pferde | 14 | 0 | 0 |
| 6. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,01 ccm inakt. Choleraserum vom Pferde | 0 | 5 | 0 |
| 7. 0,3 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lösung + 0,1 ccm inakt. Choleraserum vom Pferde | 0 | ca. 8000 | 5200 |

Inaktivierte Sera I—III ergaben ungehemmtes Wachstum, 0,3 ccm aktives Serum tötete bis auf 12 Keime ab.

V. Es werden von Rinderseren hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum I 6 ccm + 2 Agarkulturen Cholera | Während 1 Std. Aufenthaltes bei 37° tritt immer erneute Agglutination auf. Zentrifugiert und verwendet |
| › II 6 › + 3 › › | |
| › III 6 › + 6 › › | |

1) Die Bakterienmenge zu Beginn des Versuches betrug für die Öse ∞, 2400—4000, 18—20000.

Versuch mit Ösenaussaat.

| | Serum I | II | III |
|---|---|---|---|
| 1. 1 ccm Serum | 39 | ca. 15000 | ca. 50000 |
| 2. 1 » » + 0,005 ccm Cholera-immunserum vom Pferde | 53 | 17 | 7760 |
| 3. 1 ccm Serum + 0,01 ccm Cholera-immunserum vom Pferde | 32 | 51 | 12000 |
| 4. 1 ccm Serum + 0,1 ccm Cholera-immunserum vom Pferde | 420 | 272 | 6968 |

Nach Herstellung der Einsaat enthielten die Sera I—III in der Öse: 8200, 4200, 4500 Keime. 1 ccm Normalrinderserum tötete 3260 Vibrionen völlig ab.

Die Eigenart der bakteriziden Wirkung des Serums ermöglicht sofort eine genauere Analyse der Beeinflussung, welche Vibrionen auf das Serum ausüben. Denn deren komplexe Natur ist unbestritten. Führt man die Bakteriolyse auf besondere Stoffe, die Bakteriolysine, zurück, so müssen diese aus zwei Anteilen, dem hitzebeständigen Immunkörper und dem hitzeempfindlichen Komplement bestehen, von denen nach der durch Ehrlichs Versuche eingeführten Vorstellungsweise, der erstere das Herantreten des zweiten eigentlich wirksamen an die Vibrionen vermittelt.

Die Versuche zeigen klar, dafs durch Behandlung eines Rinderserums mit lebenden Vibrionen der Immunkörper in erster Linie leiden mufs. Denn es hängt von der Menge der Bakterien ab, ob ein Serum seine bakterizide Wirkung mehr oder weniger oder vollständig verliert. Je immunkörperreicher ein Serum von Natur aus (Rinderserum — Kaninchenserum) ist oder durch künstlichen Zusatz spezifischen Immunserums gemacht wird, um so mehr Bakterien sind zur Bakteriolysebehinderung notwendig.

Für die Richtigkeit dieser Folgerung spricht zwingend der zweite Teil der hier mitgeteilten Versuche. Denn ein bakteriolytisch durch Vibrionenbehandlung unwirksam gewordenes Serum erlangt seine Fähigkeit zurück, sobald man durch Zusatz von spezifischem Immunserum den verloren gegangenen Immunkörper ersetzt. Gewisse Unregelmäfsigkeiten kommen dabei vor und namentlich die sog. Komplementablenkung spielt dabei eine grofse Rolle. Aber der weitere Schlufs ist ebenfalls zwin-

gend, dafs bei Behandlung eines Serums mit Vibrionen, einer Mafsregel also, bei der Bakteriolyse stattfinden mufs und Bakteriolysine in gröfster Menge in Anspruch genommen werden müssen, das Komplement wirksam erhalten bleibt. Fafst man die oben gegebene Vorstellungsweise Ehrlichs ganz streng auf, so bildet dieser Befund einen Widerspruch gegen dieselbe. Denn das durch Vermittelung des Immunkörpers an die Vibrionen gebundene Komplement mufs bei vollendeter Reaktion verbraucht worden sein. Aber unbedingt ist das nicht nötig. Denn einerseits kann das Komplement nach Erfüllung seiner durch den Immunkörper vermittelten Aufgabe wieder frei oder regeneriert werden, anderseits wäre es denkbar, dafs das Komplement auch im Rinderserum in einem so grofsen Überschusse über dem Immunkörper vorhanden ist, dafs seine Bindung durch den gesamten Immunkörpergehalt eines Serums noch genug zurückläfst, um weiter wirksam zu bleiben. Die letztere Annahme läfst sich allerdings schwer mit der Tatsache vereinigen, dafs künstliche Erhöhung des Immunkörpergehaltes die Wirkung der Bakterienbehandlung eines Serums abschwächt oder beseitigt.

Wenn im Serum der Immunkörpergehalt durch Bakterien bis zum Verschwinden desselben verringert werden kann, so verlieren diese anderseits ihr Vermögen, jetzt noch neues Serum bakteriolytisch unwirksam zu machen.

I 1 Agarkultur Cholera wird bei stärkster Agglutination mit 5 ccm aktivem Rinderserum bei 37° behandelt, nach 1 Std. zentrifugiert, der Satz gewaschen (ca. 20 ccm NaCl-Lösung) und zu 1 ccm aktivem Rinderserum zugesetzt, das nach 1 Std. Behandlung bei 37° wieder klar zentrifugiert wird. Es hatte nichts von seiner bakteriziden Wirkung verloren, während 1 Agarkultur normaler Vibrionen jede Bakteriolyse von 1 ccm Serum verhindert hatte.

II. 1 Agarkultur Cholera wird mit 2,5 ccm aktivem Rinderserum wie bei I behandelt. Der danach übrig bleibende Satz vermochte 1 ccm frisches Rinderserum ebenfalls nicht merklich zu beeinflussen.

Derartige Ergebnisse sprechen natürlich sehr zugunsten der Ehrlichschen Auffassung des Bakteriolysemechanismus; eine neuerliche Bindung des Immunkörpers kann nicht mehr stattfinden, wenn alle Rezeptoren der Vibrionen schon besetzt sind.

Direkt zu widersprechen ist dem nicht; überzeugt man sich aber durch ein mikroskopisches Präparat von dem, was aus den ursprünglichen Vibrionen geworden ist, so kann man auch andere Momente für die jetzt abhanden gekommene Wirkung[1]) der Reste verantwortlich machen; denn wirkliche Vibrionen sind eben nicht mehr da.

Einen ähnlichen Einflufs wie die geformte, übt auch die gelöste Cholerasubstanz auf die Bakteriolyse des Rinderserums aus, indem Vibrionenextrakte sie geradeso wie die Agglutination und Präzipitation zu hemmen vermögen.

I. Versuch mit Kaninchenserum Einsaat 20—30000; Versuch mit Ösenaussaat.

| | Kaninchenser. | Choleraextrakt | Choleraimmunserum von Kaninchen | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | | | 0 |
| 2. | 0,25 » | + 0,01 ccm | | über 50 000 |
| 3. | 0,25 » | + 0,01 » | + 0,0001 ccm | 2600 |
| 4. | 0,25 » | + 0,01 » | + 0,001 » | 0 |
| 5. | 0,25 » | + 0,01 » | + 0,01 » | 0 |
| 6. | 0,25 » | + 0,1 » | | über 50 000 |
| | | | Choleraimmunserum | |
| 7. | 0,25 » | + 0,1 » | + 0,0001 ccm | » 50 000 |
| 8. | 0,25 » | + 0,1 » | + 0,001 » | 1224 |
| 9. | 0,25 » | + 0,1 » | + 0,01 » | 213 |

II. Versuch mit Rinderserum und Cholerawasserextrakt. Kleine Einsaat von 3—5000 Keimen. Ösenaussaat.

| | | + 0,1 ccm Rinderserum | + 0,2 ccm Rinderserum |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,0001 ccm Extrakt | 0 | 0 |
| 2. | 0,001 » » | 0 | 0 |
| 3. | 0,01 » » | 0 | 0 |
| 4. | 0,05 » » | 1736 | 62 |
| 5. | 0,1 » » | ∞ | ∞ |

Alle Proben waren mit NaCl-Lösung auf das Volumen von 1 ccm gebracht worden. Rinderserum allein tötete vollständig ab.

---

1) Nach Analogie mit später zu beschreibenden Wirkungen der Präzipitate auf aktives Serum dürften möglicherweise auch solche Vibrionenreste noch die Bakteriolyse des Serums beeinflussen können. Eine genaue Untersuchung fehlt. Vgl. S. 416 ff.

III. Rinderserum. Einsaat 10—12000 Keime. Ösenaussaat.

| | Rinderserum | Na Cl-Lösung | Extrakt | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + 0,9 ccm | | 0 |
| 2. | 0,1 » | + 0,8 | + 0,001 ccm | 0 |
| 3. | 0,1 » | + 0,8 | + 0,01 » | 4000 |
| 4. | 0,1 » | + 0,85 | + 0,05 » | über 50000 |
| 5. | 0,1 » | + 0,8 | + 0,1 » | |

IV. Rinderserum. Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur. Die gesamten Proben nach 4 Std. Aufenthalt bei 37° zu Platten verarbeitet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm aktives Rinderserum | | 0 |
| 2. | 0,2 » » » | + 0,001 ccm Extrakt | 3 |
| 3. | 0,2 » » » | + 0,005 » » | 0 |
| 4. | 0,2 » » » | + 0,01 » » | 42 |
| 5. | 0,2 » » » | + 0,05 » » | 1800 |
| 6. | 0,2 » » » | + 0,1 » » | ca. 300000 |
| 7. | 0,2 » » » | + 0,15 » » | ∞ |

Ausnahmsfälle kamen bei diesen Versuchen keine vor, höchstens Schwankungen der Menge des Extraktes, die man zusetzen mufste, um ungehemmtes Vibrionenwachstum im Serum zu erhalten. Im allgemeinen waren aber 0,05—0,1 ccm Extrakt hinreichend, um 0,1 ccm Rinderserum bei gleichzeitigem Zusatz und Einsaat unwirksam zu machen.

Dieses Ergebnis kann man zunächst wieder durch die Annahme von freien Rezeptoren nach Neifser und Shiga zu erklären versuchen. Doch ist, abgesehen von der durch Weil genauer studierten Agglutinationshemmung durch Extrakte, gerade für Bakteriolyse durch Bail und Kikuuchi gezeigt worden, dafs diese Annahme unmöglich ist. Der Hauptversuch dagegen ist, dafs bei gleichzeitiger Anwesenheit von Immunkörper, Extrakt und Bazillen in derselben Flüssigkeit die Besetzung oder Sensibilisierung der Bazillen ungehindert stattfindet, was natürlich bei Anwesenheit von freien Rezeptoren, welche die Immunkörper an sich reifsen müfsten, nicht möglich wäre. Auch auf das Komplement wirkt der Extrakt nicht ein. Dennoch besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Extraktwirkung und Immunkörpergehalt eines Serums. Das beweist einerseits der Umstand, dafs man zur Hemmung der Bakteriolyse eines Serums um so mehr Extrakt braucht, je immunkörperreicher dasselbe ist, anderseits die sofort zu schildernde Tatsache, dafs nach Behandlung

eines Serums mit Extrakt der Immunkörper verschwindet und damit auch die Bakteriolyse, die aber durch nachträglichen Zusatz von Immunserum wieder auftritt.

Bekanntlich ist dem Studium der Hemmung von Serumwirkungen, namentlich der Hämolyse, durch Bakterienextrakte u. dgl. grofse Aufmerksamkeit geschenkt worden, seitdem durch die darauf beruhenden Versuche von Bordet, Gay, Moreschi u. v. a. die Existenz von Antikomplementen geleugnet, dann aber namentlich durch Wassermann und seine Mitarbeiter diese Phänomene für diagnostische Zwecke verwendet wurden. So verlockend es wäre, auf diesen Gegenstand, über den sich in kurzer Zeit eine kleine Literatur gebildet hat, einzugehen, da zweifellos die hier zu erwähnenden Befunde in dieses Gebiet hineinfallen, so möge doch die Darstellung rein auf das normale Rinderserum beschränkt bleiben.

Bezüglich der Literatur sei auf die sorgfältige zusammenfassende und kritische Übersicht von Weil hingewiesen.

Beobachtet man, was in einer mit Vibrionen besäten Mischung von aktivem Rinderserum und Extrakt, die mehr oder minder bakteriolytisch unwirksam geworden ist, geschieht, so bemerkt man, wie sie sich nach kurzer Zeit trübt und dann einen Niederschlag ausfallen läfst: mit einem Worte, es findet Präzipitation statt. Es liegt natürlich nichts näher, als auf die Präzipitation das Ausbleiben der Bakteriolyse zu beziehen, was sich kurz so ausdrücken liefse, dafs in demselben Serum nicht gleichzeitig Bakteriolyse und Präzipitation ungehindert stattfinden können. Man kann nun leicht feststellen, dafs die Stärke der Bakteriolysehemmung abhängt: 1. bei demselben Serum von der Stärke bzw. der Menge des zugesetzten Extraktes. Sehr wenig konzentrierte Extrakte hemmen Rinderserum fast gar nicht, konzentrierte erst von einer bestimmten Dosis an. 2. Bei dem gleichen Extrakte von der Stärke der Bakteriolyse des verwendeten Serums. So braucht man in vergleichenden Versuchen sehr viel mehr Extrakt um die Bakteriolyse des Rindserums, als um die des Kaninchenserums zu hemmen, auch wenn man durch

verschiedene hohe Einsaat von Vibrionen für einen Ausgleich zu sorgen trachtet.

Versuch mit dem gleichen Extrakte. Einsaat für Kaninchenserum 9000, für Rinderserum 61 000 Vibrionen.

| | Serum | Extrakt | Kaninchenserum | Rinderserum |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm | + 0,001 ccm | 7400 | 3 |
| 2. | 0,2 » | + 0,05 » | gut 100 000 | 0 |
| 3. | 0,2 » | + 0,01 » | ∞ | 2 |
| 4. | 0,2 » | + 0,05 » | ∞ | 0 |
| 5. | 0,2 » | + 0,1 » | ∞ | 95 |
| 6. | 0,2 » | + 0,2 » | ∞ | über 200 000 |

Da die Stärke der Serumbakteriolyse sehr wesentlich durch den Gehalt an Immunkörpern bedingt ist, und sich Sera verschiedener Tiere hauptsächlich dadurch unterscheiden, so läfst sich von vornherein vermuten, dafs die Konzentration der Immunkörper das Entscheidende für die Wirkung der Extrakte sein wird. An jedem beliebigen Serum, dessen Immunkörpergehalt man durch Zusatz von inaktivem spezifischen Serum erhöhen kann, läfst sich das ohne Schwierigkeit zeigen.

I. Meerschweinchenserum. Die Reihe A enthält für jede Probe 0,0001 ccm, die Reihe B 0,001 ccm Immunserum. Einsaat überall ca. 20 000 Keime.

| | Meerschweinchenserum | Extrakt | A | B |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | | 0 | 0 |
| 2. | 0,25 » | + 0,01 ccm | 228 | 0 |
| 3. | 0,25 » | + 0,05 » | ∞ | 528 |
| 4. | 0,25 » | + 0,1 » | ∞ | 9840 |

Das Meerschweinchenserum ohne Zusatz von Immunserum lieferte 40 000 Kolonien, Zugabe der geringsten Extraktmenge beseitigte auch diese Spur von Entwicklungshemmung.

II. Kaninchenserum Anordnung wie im Versuche I.

| | Kaninchenserum | Extrakt | A | B |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | | 0 | 0 |
| 2. | 0,25 » | + 0,01 ccm | 0 | 0 |
| 3. | 0,25 » | + 0,05 » | 22 | 40 |
| 4. | 0,25 » | + 0,1 » | 7200 | 448 |
| 5. | 0,25 » | + 0,15 » | ∞ | ca. 30 000 |

Das Kaninchenserum ohne Immunserum tötete bis auf ca. 200 Kolonien ab. 0,05 ccm Extrakt beseitigte die Bakteriolyse vollständig.

III. Rinderserum. Anordnung wie im Versuche I. Einsaat 0,05 ccm Bouillonkulturen Cholera.

| | Rinderserum | Extrakt | A | B | C (ohne Immunserum) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,2 ccm | | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 0,2 » | + 0,01 ccm | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 0,2 » | + 0,05 » | 0 | 0 | 2400 |
| 4. | 0,2 » | + 0,1 | 12 | 3 | ca. 20000 |
| 5. | 0,2 » | + 0.15 | 9000 | 464 | ∞ |
| 6. | 0,2 » | + 0,2 | ∞ | ∞ | ∞ |

Die Stärke der Bakteriolysehemmung durch Extrakte hängt aber noch ab 3. von der Art des Zusatzes des Extraktes. Die Menge desselben, die man braucht, um bei gleichzeitiger Vibrioneneinsaat die Bakteriolyse aufzuheben, ist verhältnismäfsig grofs im Vergleich zu jener, die genügt, um denselben Erfolg bei vorzeitigem Zusatz herbeizuführen.

Es ist bereits erwähnt, dafs Mischung halbwegs gröfserer Mengen von Extrakt mit aktivem Rinderserum schnell Trübung und Präzipitation herbeiführen. Wartet man nun diese ab, ehe man Vibrionen einsät, entfernt ev. das entstandene Präzipitat durch Zentrifugieren, so ist die bakteriolytische Serumwirkung genau so verschwunden wie es bei früher mitgeteilten Versuchen die agglutinierende und präzipitierende war. Aber die Menge des Extraktes, die bei dieser Anordnung zur Aufhebung der Bakteriolyse genügt, ist verhältnismäfsig eine sehr geringe.

I. Einsaat: 0,05 ccm einer 14 Std. alten Bouillonkultur

| | Serum | Extrakt | A. Extrakt u. Vibrionen gleichzeitig zugesetzt | B. Vibrionen erst nach erfolgter Präzipitation zugesetzt. Nicht zentrifugiert. |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + 0,001 ccm | 0 | 372 |
| 2. | 0,1 » | + 0,003 » | 0 | 408 |
| 3. | 0,1 » | + 0,006 » | 18 | ca. 20000 |
| 4. | 0,1 » | + 0,01 » | 132 | ∞ |
| 5. | 0,1 » | + 0,03 » | ca. 5000 | ∞ |
| 6. | 0,1 » | + 0,05 » | ∞ | ∞ |
| 7. | 0,1 » | + θ | 0 | — |

II. Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | Serum | Extrakt | A | B |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + 0,001 ccm | 2 | 60 |
| 2. | 0,1 » | + 0,005 » | 0 | 2032 |
| 3. | 0,1 » | + 0,01 » | 61 | ca. 30000 |
| 4. | 0,1 » | + 0,05 » | ca. 10000 | ∞ |
| 5. | 0,1 » | + θ | 0 | — |

Der oben erwähnte Satz, dafs in demselben Serum Präzipitation und Bakteriolyse nicht gleichzeitig stattfinden könnten, bedarf daher einer wesentlichen Korrektur: sind geformte und gelöste Bakteriensubstanz gleichzeitig in einem Serum vorhanden, so richtet sich die Aktivität desselben zwar gegen beide, aber sozusagen nur verteilt, mit halber Kraft. Ist nur gelöste Substanz (in entsprechender Menge) vorhanden, so richtet sie sich dann gegen diese, und für eine nachfolgende Bakteriolyse bleibt nichts übrig. Die Beobachtungen an der Präzipitation (vgl. S. 348 ff.) haben gezeigt, dafs auch das Umgekehrte stattfinden kann, d. h. dafs die ganze Serumaktivität für geformte Vibrionensubstanz verwendet wird, so dafs eine nachträgliche Präzipitation nicht mehr stattfindet.

Konnte man das Verschwinden der präzipitierenden Serumwirkung nach Bakterienbehandlung noch so erklären, dafs zuerst durch eigene Bakteriolysine Cholerasubstanz frei gemacht und diese dann durch Präzipitine ausgefällt würde, so ist schlechterdings nicht einzusehen, wieso Vorgänge an der gelösten Vibrionensubstanz, die durch Serumstoffe sui generis veranlafst werden, die selbständig vorhandenen Serumbakteriolysine beeinträchtigen sollen. Es wäre nun daran zu denken, dafs bei der komplexen Natur der Bakteriolysine, die eine, empfindlichere Komponente, das Komplement leiden würde, wie man ja annimmt, dafs dasselbe durch sehr verschiedene heterogene Dinge (Behandlung mit Hefe, Aleuronat u. dgl.) beseitigt werde. Es läfst sich aber sehr leicht und sicher zeigen, dafs auch beim Präzipitationsvorgange nur der Immunkörper des Rinderserums abnimmt oder verloren geht, während das Komplement nachweisbar bleibt.

Die Zahl der Versuche, welche diesen wichtigen Punkt betrafen, ist eine sehr grofse. Sie wurden meist in der Art angestellt, dafs daraus noch ein anderes, nicht minder wichtiges Ergebnis hervorgeht. Bei der Präzipitation eines Extraktes geht nämlich nicht nur die bakteriolytische Kraft des dazu verwendeten Serums verloren, sondern die rückbleibende Flüssigkeit

hat auch keinen Hemmungswert für ein frisches Serum mehr, d. h. auch die Extraktwirkung wird vernichtet.

I. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | 0,75 ccm Extrakt | + 1,5 ccm akt. Rinderserum | Die Proben bleib. b. Zimmertemperatur üb. Nacht stehen. Dabei bildet sich in I ein starkes typisches Präzipitat, das durch Zentrifugieren entfernt wird. |
| II. | 0,75 › › | + 1,5 › NaCl (peptonhalt.) | |
| III. | 0,75 › NaCl-Lös. | + 1,5 › akt. Rinderserum | |

Einsaat in alle Proben sehr klein: 3—7000 Keime. Ösenaussaat.

| | | | NaCl-Lösung | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,15 ccm | III | + 0,85 ccm | | 0 |
| 2. | 0,15 › | I | + 0,85 › | | ∞ |
| 3. | 0,15 › | III | + 0,7 › | + 0,15 ccm I | 312 |
| 4. | 0,15 › | III | + 0,55 › | + 0,3 › I | 856 |
| 5. | 0,15 › | III | + 0,7 › | + 0,15 › II | ∞ |
| 6. | 0,15 › | III | + 0,55 › | + 0,3 › II | ∞ |
| 7. | 0,15 › | I | + 0,6 › | + 0,25 › Rinderserum $^{1}/_{2}$ Std. 60° | 464 |
| 8 | 0,15 › | I $^{1}/_{2}$ Std. 60° | + 0,6 › | + 0,25 › › › | ∞ |

II. Vergleich der Wirkung einer Extrakt- und Vibrionenbehandlung von Rinderserum.

Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | 3 ccm akt. Rinderser. | + 1,5 ccm Extrakt | 1 Std. 37°. In I Trübung u. Fällung, in II stärkste Agglutination. Zentrifugiert und verwendet. |
| II. | 3 › › › | + 2 Kulturen Cholera in 1,5 ccm NaCl-Lösg. | |
| III. | 3 › › › | + 1,5 ccm NaCl-Lösung | |
| IV. | 3 › NaCl-Lösung | + 1,5 › Extrakt | |

Einsaat 6—9000 Keime.

| | | | NaCl-Lösung | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,15 ccm | III | + 0,85 ccm | | 0 |
| 2. | 0.15 › | I | + 0,85 › | | über 100 000 |
| 3 | 0,15 › | III | + 0,65 › | + 0,2 ccm I | 207 |
| 4. | 0,15 › | III | + 0,55 › | + 0,3 › I | 248 |
| 5. | 0,15 › | III | + 0,65 › | + 0,2 › IV | 5840 |
| 6. | 0,15 › | III | + 0,55 › | + 0,3 › IV | 27 800 |
| 7. | 0,15 › | I | + 0,75 › | + 0,1 › Rinderserum $^{1}/_{2}$ Std. 60° | 864 |
| 8. | 0,15 › | I | + 0,6 › | + 0,25 › › › | 192 |
| 9. | 0,15 › | I | + 0,35 › | + 0,5 › › › | 1040 |
| 10. | 0,15 › | I | + 0 › | + 0,85 › › › | 3200 |
| 11. | 0,15 › | II | + 0,85 › | | über 100 000 |
| 12. | 0,15 › | III | + 0,65 › | + 0,2 › II | 17 |
| 13. | 0,15 › | III | + 0,55 › | + 0,3 › II | 12 |
| 14. | 0,15 › | II | + 0,75 › | + 0,1 › Rinderserum $^{1}/_{2}$ Std. 60° | 328 |
| 15. | 0,15 › | II | + 0,6 › | + 0,25 › › › | 992 |
| 16. | 0,15 › | II | + 0,35 › | + 0,5 › › › | ca. 4000 |
| 17. | 0,15 › | II | + 0 › | + 0,85 › › › | 2040 |
| 18. | 1 › | Rinderserum $^{1}/_{2}$ Std. 60°. | | | über 100 000 |

Mit den gleichen Proben wurde ein Präzipitationsversuch angestellt, der ergab, dafs bei Zusatz von frischem Extrakt die Probe I u. II nicht mehr oder (II) nur minimal noch präzipitierten. Die Ergänzung von II mit inaktivem Rinderserum gelang, die von I nicht.

Man sieht sofort, dafs die Behandlung eines Rinderserums mit Vibrionen zwar die Bakteriolyse völlig aufhebt, dennoch aber keine hemmenden Extrakte ergibt, wie auch auf diese Weise (vgl. S. 332) keine fällbaren Cholerastoffe durch Präzipitation nachweisbar werden. Die Ergänzung der verlorenen Bakteriolyse mit erhitztem Rinderserum gelang in diesem und auch noch anderen Versuchen recht zufriedenstellend. Dafs in anderen Versuchen Mifserfolge zu verzeichnen waren, hat seinen Grund wahrscheinlich darin, dafs bei der Benutzung inaktivierten Normalserums auf den Erhitzungsgrad nicht mit genügender Sorgfalt geachtet wurde. Auf diesen scheint aber sehr viel anzukommen, indem im allgemeinen höher erwärmte Seren schlechter ergänzen, ohne dafs man deshalb von einem Zugrundegehen der Immunkörper reden könnte. Systematische Versuche darüber stehen aus; die Möglichkeit einer Reaktivierung der Bakteriolyse der mit Extrakt behandelten Sera wird aber durch Versuche mit Immunseren über jeden Zweifel sichergestellt.

I. Es werden hergestellt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| I. | 2 ccm Rinderser. | + 0,4 ccm Extr. | + 0,6 ccm NaCl-Lösg. | Präzipitation. Das Präzipitat nicht abzentrifugiert. |
| II. | 2 » » | + 1 » » | + 0 | |
| III. | 2 » » | + 0 | + 1 » » | |

Einsaat 16–20000.

| | von I | von II | von III |
|---|---|---|---|
| 0,3 ccm + 0,1 ccm NaCl | 640 | ca. 20000 | 120 |
| 0,3 » + 0,0001 ccm Immunserum | 0 | 4480 | 6 |
| 0,3 » + 0,0005 » » | 6 | 3220 | 0 |
| 0,3 » + 0,001 » » | 320 | 20 | 0 |
| 0,3 » + 0,005 » » | 5 | 420 | 0 |
| 0,3 » + 0,01 » » | 0 | 142 | 0 |

II. Es werden hergestellt:

| | akt. Rinderser. | Extrakt | NaCl-Lösg. | |
|---|---|---|---|---|
| I. | 2 ccm | + 0,1 ccm | + 0,4 ccm | 1 Std. 37°. Die Proben I—III zeigen typische Präzipitation, werden klar zentrifugiert und verwendet. |
| II. | 2 » | + 0,2 » | + 0,3 » | |
| III. | 2 » | + 0,5 » | + 0 » | |
| IV. | ½ » NaCl-Lösg | + 0 » | + 1 » | |
| V. | 2 ccm | + 0,5 » | + 0 » | |

Einsaat 0,05 ccm einer ca. 12 Std. alten Bouillonkultur. Sehr wirksamer Extrakt.

| | von I | von II | von III | von IV |
|---|---|---|---|---|
| 0,25 ccm + 0,1 ccm NaCl-Lösung | 562 | ca. 10000 | ∞ | 0 |
| 0,25 » + 0,0001 ccm Choleraimmunserum | 0 | 240 | ∞ | 0 |
| 0,25 » + 0,001 » » | 0 | 0 | ca. 15000 | 0 |
| 0,25 » + 0,01 » » | 0 | 0 | 790 | 0 |

| | |
|---|---|
| 0,25 ccm von IV + 0,05 ccm von III (1/2 Std. auf 60° erhitzt) | 0 |
| 0,25 » » IV + 0,1 » » III » | 4 |
| 0,25 » » IV + 0,5 » » III » | 328 |
| 0,25 » » IV + 0,05 » » V » | ca. 8000 |
| 0,25 » » IV + 0,1 » » V » | ∞ |
| 0,25 » » IV + 0,5 » » V » | ∞ |

III. Es werden hergestellt:

| | Rinderserum | Extrakt | NaCl-Lösung | |
|---|---|---|---|---|
| I. | 2 ccm | + 0,4 ccm | + 0,6 ccm | Über Nacht bei Zimmertemperatur entstehen in I und II mächtige Niederschläge, die abzentrifugiert werden. |
| II. | 2 » | + 1 » | + 0 » | |
| III. | 2 » | + 0 » | + 1 » | |
| | NaCl-Lösg | | | |
| IV. | 2 ccm | + 1 » | + 0 » | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur

| | von I | von II |
|---|---|---|
| 0,3 ccm + 0,1 ccm NaCl-Lösung | 4480 | ca. 300000 |
| 0,3 » + 0,0001 ccm Choleraimmunserum | 6 | 5420 |
| 0,3 » + 0,0005 » » | 8 | 320 |
| 0,3 » + 0,001 » » | 2 | 960 |
| 0,3 » + 0,005 » » | 0 | 64 |

von Serum III

| | |
|---|---|
| 0,3 ccm + 0,1 ccm NaCl | 0 |
| 0,3 » + 0,005 ccm Choleraimmunserum | 0 |
| 0,3 » + 0,15 » von II | 0 |
| 0,3 » + 0,3 » » II | 1280 |
| 0,3 » + 0,6 » » II | 6200 |
| 0,3 » + 0,15 » » IV | 530 |
| 0,3 » + 0,3 » » IV | 17400 |
| 0,3 » + 0,6 » » IV | über 300000 |

IV. Es werden hergestellt:

| | | |
|---|---|---|
| I. | 2 ccm Rinderser. + 1 ccm Extr. + 1 ccm NaCl-Lösg. | Über Nacht entstehen in I u. II mächtige Niederschläge, d. abzentrifugiert werden. |
| II. | 2 » » + 2 » » + 0 » » | |
| III. | 4 » » + 0 » » + 2 » » | |
| IV. | 2 » NaCl-Lösg. + 2 | |

| | von I | von II | von III |
|---|---|---|---|
| 0,4 ccm + 0,1 ccm NaCl-Lösung | ∞ | ∞ | 0 |
| 0,4 » + 0,0005 ccm Choleraimmunsera | 20—30000 | ∞ | |
| 0,4 » + 0,001 » » | 1840 | 20—30000 | |
| 0,4 » + 0,005 » » | 3000 | 10000 und darüber | |
| 0,4 » + 0,01 » » | 1280 | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0,4 ccm Serum III | + 0,2 ccm von I | + 0,4 ccm NaCl-Lösung | 0 |
| 0,4 » » III | + 0,4 » » I | + 0,2 » » | 640 |
| 0,4 » » III | + 0,6 » » I | + θ » » | ca. 10000 |
| 0,4 » » III | + 0,2 » » II | + 0,4 » » | » 10000 |
| 0,4 » » III | + 0,4 » » II | + 0,2 » » | über 20000 |
| 0,4 » » III | + 0,6 » » II | + θ » » | |
| 0,4 » » III | + 0,2 » » IV | + 0,4 » » | ca. 20—60000 |
| 0,4 » » III | + 0,4 » » IV | + 0,2 » » | |
| 0,4 » » III | + 0,6 » » IV | + θ » » | $\infty$ |
| 0,4 » » III | + θ » » IV | + 0,6 » » | 0 |

Das Ergebnis ist bei einfachster Darstellung folgendes: Durch Zusatz gelöster Cholerasubstanz zu aktivem Rinderserum entsteht Präzipitation. Ist diese erfolgt, so hat die bakteriolytische Fähigkeit des Serums gelitten oder ist vernichtet und zwar, wie sich zeigen läfst, durch Verminderung oder Verlust des hitzebeständigen Anteils der Serumwirkung, also des Immunkörpers. Der hitzeunbeständige, das Komplement, bleibt aber nachweisbar. Ob und in welchem Grade er vermindert ist, läfst sich natürlich nur sehr schwer entscheiden. Durch den Präzipitationsvorgang ist aber auch die bakteriolysehemmende Wirkung der gelösten Cholerasubstanz verloren gegangen, die in Kontrollen sofort hervortritt, wo die gleiche Menge Extraktes statt mit Serum mit einer indifferenten Flüssigkeit verdünnt wurde. Dafs es sich tatsächlich dabei um eine Wirkung der Serumaktivität, nicht der sonstigen Serumbestandteile handelt, erkennt man leicht durch Versuche, wie der folgende:

Es werden hergestellt:

| | Rinderserum aktiv | Extrakt | NaCl-Lösung | |
|---|---|---|---|---|
| I | 1 ccm | + 0,25 ccm | + 0,25 ccm | In I und II entsteht Präzipitation, IV und V bleiben klar. Die Präzipitate werden durch Zentrifugieren entfernt. |
| II | 1 » | + 0,5 » | + θ » | |
| III | 1 » | + θ » | + 0,5 » | |
| | Rinderser. 1/2 Std. 62° | | | |
| IV | 1 ccm | + 0,25 » | + 0,25 » | |
| V | 1 » | + 0,5 » | + θ » | |
| VI | 1 » | + θ » | + 0,5 » | |
| | NaCl-Lösung | | | |
| VII | 1 ccm | + 0,5 » | | |

| aktives Rinderser. | (1/2 Std. 62°) | NaCl-Lös. | von I | II | III | IV | V | VI | VII |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm | + 0,06 ccm | + 0,24 ccm | 0 | 0 | 0 | 3900 | 264 | 0 | 1856 |
| 0,1 » | + 0,15 » | + 0,15 » | 20 | 63 | 0 | üb. 20000 | üb. 200000 | 0 | ca. 18000 |
| 0,1 » | + 0,3 » | + θ » | 928 | 3700 | 0 | 600000 | $\infty$ | 0 | $\infty$ |

Wenn man, um ein ganz simples Beispiel zu wählen, eine Cl-Lösung mit einer Ag Lösung mischt und man sieht, wie unter Bildung eines unlöslichen Niederschlages sowohl Cl als Ag verschwinden, so besteht kein Zweifel darüber, dafs sich beide, vorläufig chemisch unwirksam, im Niederschlage finden müssen. Es liegt kein Grund vor, bei der Choleropräzipitation anders zu schliefsen: auch hier mufs die Cholerasubstanz mit dem physischen Träger des hitzebeständigen Anteils der Serumaktivität zu einer unlöslichen Verbindung, dem Präzipitate, zusammengetreten und dadurch die entgegengesetzte Wirkung der gemischten beiden Flüssigkeiten verloren gegangen sein. Das gibt, kurz formuliert, den Satz, dafs Präzipitation nichts anderes ist als das Zusammentreten von Serumimmunkörper mit Cholerasubstanz zu einer unlöslichen Verbindung und zwar unter besonderen, dem Studium zugänglichen Verhältnissen. Das wichtigste davon ist die Rolle des sog. Komplementes. Dieses mufs einen wesentlichen Anteil bei dem Entstehen der Verbindung haben. Denn wenn es zerstört ist, so bleibt die Präzipitation aus, aber auch der zugesetzte Extrakt erfährt keine Einbufse an seiner bakteriolysehemmenden Wirkung, wie sie aktives Serum so schön hervorbringt.

Wenn aber die Komplementwirkung nach Beseitigung der Bakteriolyse durch Extraktpräzipitation noch vorhanden bleibt und jederzeit durch eine geeignete Versuchsanordnung nachgewiesen werden kann, so kann das Komplement, als reale Substanz betrachtet, nicht mit in die Verbindung von Immunkörper und Bakteriensubstanz eingetreten sein, obwohl es zu deren Entstehung notwendig war. Hierfür gibt es nur eine sofort erkenntliche Analogie, wenn man dem Komplemente die Natur eines Katalysators, eines Fermentes zuschreibt. Während man aber im Beispiele von Cl und Ag jederzeit in der Lage ist, das verschwundene Ag und Cl durch Analyse des Niederschlages nachzuweisen, ist ähnliches bei der Präzipitation augenblicklich noch nicht möglich. Deshalb bleibt eine andere Annahme noch möglich. Gesetzt, es wäre der Immunkörper in einer Art kolloidalen Lösung vorhanden und der Zusatz von Extrakt verändere den

Zustand der Flüssigkeit derart, dafs er nicht mehr gelöst bleiben kann, so kommt es zu einem Ausfallen desselben. Dem steht allerdings die offenkundige quantitative Gesetzmäfsigkeit des ganzen Vorganges entgegen und besonders das Verschwinden auch des anderen Teils der reagierenden Substanzen. Aber bei der dürftigen Bekanntschaft mit diesen ist es doch angezeigt, zu berücksichtigen, dafs sie z. B. durch Adsorption u. dgl. vermindert werden könnte. Abgesehen aber von der Schwierigkeit, die Natur der Komplemente zu erklären, lassen sich auch gewisse Gesetzmäfsigkeiten der Vorgänge aufweisen, welche die erste Annahme fast sicher machen.

Vorher mufs aber noch eine, schon in den bisher beschriebenen Versuchen bisweilen hervortretende Erscheinung erwähnt werden, die sich so ausdrücken läfst, dafs bei Anwesenheit von gelöster Cholerasubstanz in einem bakteriolytischen Rinderserum und Zusatz von Immunserum sehr leicht die sog. Komplementablenkung eintritt, die bei normalem Rinderserum erst durch einen grofsen Überschufs von spezifischen Immunkörpern zu erreichen ist.

1. werden hergestellt:

| | aktiv. Rinderserum | Extrakt | NaCl-Lösung | |
|---|---|---|---|---|
| I | 2 ccm | + 0,13 ccm | + 0,87 ccm | Während 2 Std. Anfenthaltes bei 37° entsteht in I—IV typische Präzipitation. Die Präzipitate werden abzentrifugiert. |
| II | 2 » | + 0,2 » | + 0,8 » | |
| III | 2 » | + 0,4 » | + 0,6 » | |
| IV | 2 » | + 0,66 » | + 0,34 » | |
| V | 2 » | + 0 » | + 1 » | |

| NaCl-Lösung | | von I | II | III | IV | V |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,3 ccm | + 0,1 ccm | 3 | 12 | 720 | ∞ | 0 |
| | Choleraimmunserum | | | | | |
| 0,3 » | + 0,0001 ccm | 0 | 0 | 0 | 3400 | 0 |
| 0,3 » | + 0,001 » | 0 | 170 | 400 | 8000 | 0 |
| 0,3 » | + 0,01 » | 200 | 9000 | ∞ | ∞ | 0 |
| 0,3 » | + 0,05 » | ca. 4000 | 20 000 | ∞ | ∞ | 180 |
| 0,3 » | + 0,1 » | 60 000 | ∞ | ∞ | ∞ | 1200 |

II. Es werden hergestellt:

| | aktiv. Rinderserum | Extrakt | NaCl-Lösung | |
|---|---|---|---|---|
| I | 2 ccm | + 0,1 ccm | + 0,3 ccm | 2 Std. 37°. Die in I—III gebildeten Prinzipitate werden abzentrifugiert. |
| II | 2 » | + 0,2 » | + 0,2 » | |
| III | 2 » | + 0,4 » | + 0 » | |
| IV | 2 » | + 0 » | + 0,4 » | |

Einsaat ca. 40000 Keime aus einer Aufschwemmung von Agarkultur in Na Cl-Lösung.

| | von I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| 0,24 ccm + 0,1 ccm NaCl-Lösung | 3960 | 10200 | ca. 120000 | 0 |
| 0,24 » + 0,001 ccm Choleraimmunserum | 0 | 0 | 19 | 0 |
| 0,24 » + 0,01 » | 20 | 10400 | ∞ | 89 |
| 0,24 » + 0,05 » | 2992 | ∞ | ∞ | 12 |

III. Es werden hergestellt:

| | aktiv. Rinderserum | Extrakt | NaCl-Lösung | |
|---|---|---|---|---|
| I | 4 ccm | + 0,2 ccm | + 0,6 ccm | 2 Std. 37°. Die Präzipitate aus I—III wurden abzentrifugiert. |
| II | 4 » | + 0,4 » | + 0,4 » | |
| III | 4 » | + 0,8 » | + 0 » | |
| IV | 4 » | + 0 » | + 0,8 » | |

Einsaat 43000 Keime aus einer Aufschwemmung von Agarkultur in NaCl-Lösung.

| | von I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| 0,24 ccm + 0,1 ccm NaCl-Lösung | 2112 | 9600 | ca. 150000 | 0 |
| 0,24 » + 0,0001 ccm Choleraimmunserum | 0 | 0 | 1488 | 0 |
| 0,24 » + 0,0005 » | 0 | 0 | 1584 | 0 |
| 0,24 » + 0,001 » | 22000 | ∞ | ∞ | 0 |
| 0,24 » + 0,005 » | 270000 | ∞ | ∞ | 0 |
| 0,24 » + 0,01 » | ∞ | ∞ | ∞ | 384 |
| 0,24 » + 0,05 » | | | | |

Es läfst sich also zwar die durch Extraktpräzipitation verloren gegangene Bakteriolyse leicht durch Zusatz von spezifischem Immunserum ergänzen und wiederherstellen, aber vollständig normale Zustände kehren in das so behandelte Serum nicht zurück. Selbst dann, wenn die Bakteriolyse nur geschwächt, aber noch lange nicht aufgehoben war, bewirkt nur eine innerhalb gewisser Grenzen sich bewegende Menge von Immunserum wieder Bakteriolyse; wird diese überschritten, so stellt sich Wachstum der eingesäten Vibrionen ein. Die Grenzen für den Immunserumzusatz sind um so enger gezogen, je mehr Extrakt zur Ausfällung des Serums ursprünglich verwendet worden war. Wird, wie schon aus früheren Versuchsbeispielen zu ersehen ist (S. 375 Nr. IV), von vornherein zu viel Extrakt dem Serum zugesetzt, so gelingt eine Wiederherstellung der Bakteriolyse überhaupt nur unvollständig oder gar nicht mehr.

Offenbar liegt hier eine ganz neue Form des Phänomens der Komplementablenkung vor, welche, allen Erklärungsver-

suchen zum Trotz, noch durchaus rätselhaft ist. Das gröfste Verdienst um Feststellung dieses merkwürdigen Verhaltens der Serumbakteriolyse kommt Neifser und Wechsberg zu. Ihr Erklärungsversuch nimmt an, dafs die im Überschusse vorhandenen Immunkörper das Komplement an sich fesseln, dabei aber nicht genügende Avidität zum Vibrionenrezeptor haben, so dafs das fertig gebildete Bakteriolysin nicht an die Vibrionen herantreten kann und deshalb in der Flüssigkeit nutzlos verbleibt.

Von anderen Untersuchern sind Bordet und Gengou[1]), Gengou[2]), Gay[3]) u. a. zu erwähnen.

Versucht man, den Begriff der Komplementablenkung kurz zu definieren, so gelangt man zu dem Satze, dafs eine sonst mögliche Serumbakteriolyse durch einen gröfseren Überschufs von Immunkörpern aufgehoben wird. Da das Komplement in einem solchen Versuche als konstanter Faktor angesehen und behandelt werden kann, so heifst das, dafs seine Ablenkung erfolgt, sobald ein Mifsverhältnis zwischen ihm und dem Immunkörper, zugunsten des letzteren eintritt oder ganz allgemein, dafs ein Überschufs des einen reagierenden Teiles die Reaktion hemmt; denn die vorhergehenden Ausführungen berechtigen zu dem Schlusse, dafs der Immunkörper, mag man sich seine Konstitution wie immer vorstellen, tatsächlich ein realer, nicht nur ein funktionell konstruierter Bestandteil des Rinderserums ist, der an der Reaktion direkt beteiligt ist.

Geht man etwas weiter, so bemerkt man, wie auch für die Agglutination und Präzipitation durch Rinderserum die gleichen Verhältnisse gelten. Es ist bereits hervorgehoben, dafs in einigen Fällen ein Mifsverhältnis zwischen dem Choleraextrakte und den aktiven Rinderseren ein Ausbleiben oder doch eine Verzögerung der Präzipitation zur Folge hatte. War aber das Serum seines Komplementgehaltes beraubt (durch Erhitzen), so hemmte es immer. Bekanntlich nimmt man an, dafs Agglutinine und Präzipitine, namentlich des Immunserums, eine ähnliche Konstitution haben

1) Annales de l'Institut Pasteur 1901, Bd. 15.
2) Ebenda, 1902, Band 16.
3) Gay, Zentralblatt für Bakteriologie Bd. 39, Nr. 5.

wie die Bakteriolysine. Bei allen setzt man eine bindende, die Reaktion einleitende und eine fällende oder zusammenballende oder lösende, die Reaktion eigentlich durchführende Gruppe voraus. Der Unterschied zwischen Agglutininen und Präzipitinen einerseits, Bakteriolysinen (und Hämolysinen als besondere Stoffe gedacht) anderseits besteht nur darin, dafs bei den letzteren die bindende Gruppe eine so grofse Selbständigkeit gewonnen hat, dafs sie sich nicht nur isolieren, sondern auch jederzeit leicht wirksam durch verschiedene Komplemente ergänzen läfst. Für Agglutinine und Präzipitine gelingt wohl die Isolierung der bindenden Gruppe durch Hitze, Altern des Serums, verschiedene chemische Mittel, nicht so leicht aber die Ergänzung. Dennoch läfst sich die Möglichkeit für Agglutinine nachweisen und danach ist auch für Präzipitine eine solche Annahme erlaubt.

Die isolierten „Immunkörper" für Agglutination und Präzipitation sind aber nichts anderes als die Agglutinoide und Präzipitoide, deren theoretische Aufstellung[1]) aus verschiedenen Gründen notwendig wurde, namentlich wegen der Hemmung, welche sie dem normalen Reaktionsablaufe bereiten. Setzt man aber einem fertigen Agglutinin, das bindende und fällende Gruppe enthält (Immunkörper und Komplement der Agglutination) Agglutinoide (isolierte Immunkörper) hinzu, so entsteht dasselbe wie bei der bakteriolytischen Komplementablenkung, d. h. Überschufs der Bindungs- über die Fällungsgruppe. Die Analogie ist so auffallend, dafs man weiter schliefsen mufs, es könnte auch hier der Immunkörper für Agglutination und Präzipitation in die Reaktion eintreten und ein Überschufs daran machte die Reaktion selbst unmöglich.

Obwohl streng genommen nicht hierher gehörig, sei doch gleich in diesem Zusammenhange darauf hingewiesen, dafs die Reaktionen zwischen Serum und Bakterien noch auf eine entgegengesetzte Weise gehemmt oder ganz verhindert werden können. Werden zu viel Bakterien bzw. Bakteriensubstanz an-

---

1) Siehe darüber die Literatur bei Kraus und Paltauf (Handbuch von Kolle-Wassermann) und Eisenberg (Zentralblatt für Bakteriologie Bd. 40, Nr. 1 ff.)

gewendet, so bleiben Agglutination, Bakteriolyse und Präzipitation mehr oder weniger vollständig aus. Noch wichtiger aber ist die Feststellung, dafs die gelöste Cholerasubstanz der Extrakte das Geschehen an der geformten Vibrionensubstanz verhindert.

Daraus folgt aber, dafs bei gleichbleibenden Serum (Immunkörper und Komplement) ein Überschufs der fremden mit dem Serum reagierenden Substanz ebenfalls die Reaktion verhindert; denn dafs die Substanz der Choleravibrionen, an der sich alles abspielt, in die Serumreaktion eintreten mufs, bedarf nicht erst der Begründung. Da aber mindestens die Hemmung der Serumaktivität für geformte, morphologisch bestimmte Cholerasubstanz sehr gut durch gelöste, gestaltlich nicht mehr determinierte herbeigeführt werden kann, so folgt: dafs zwischen beiden ein prinzipieller Unterschied in bezug auf die Beeinflussung des Serums nicht besteht. In diesen Deduktionen liegen genug Anhaltspunkte für eine theoretische Auffassung der Serumaktivität.

Die vorhin gegebene Darstellung der Komplementablenkung ist natürlich nur eine Umschreibung der tatsächlich vorliegenden Verhältnisse. Danach mufs es zwei Mittel geben, um in einem Serum Komplementablenkung hervorzurufen. Denn ein Überschufs des Immunkörpers über das Komplement kann ebenso gut durch Zusatz des ersteren, wie durch teilweise Wegnahme des letzteren herbeigeführt werden. Das einfachste Mittel einer Komplementverminderung ist aber die Erhitzung eines Serums und nichts hindert, die sog. Inaktivierung als eine Komplementablenkung aufzufassen, bei der so viel Komplement entfernt ist, dafs der im wesentlichen intakt gebliebene Immunkörper jetzt im relativen Überschusse zurückbleibt. Darauf wird noch später einzugehen sein, ebenso wie auf die Erklärung des besonderen Falles der Komplementablenkung in einem Serum, das vorher mit Choleraextrakt behandelt wurde.

## Theorie und Gesetze der Serumaktivität.

Es sei diejenige Seite der Serumaktivität, welche die einfachsten und durchsichtigsten Verhältnisse darbietet, die präzipitierende, zum Ausgangspunkt für die folgenden Überlegungen ge-

nommen. Bei der Mischung zweier Lösungen, des Rinderserums und des Choleraextraktes, entsteht ein Niederschlag und nach Beseitigung desselben ist das Rinderserum reaktionsunfähig geworden und die gelöste Substanz des Vibrionenextraktes läfst sich nicht mehr nachweisen. Der ganze Vorgang zeigt, wie bereits oben erwähnt wurde, eine so ausgesprochene Analogie mit den einfachsten chemischen Prozessen, dafs man zu dem Schlusse berechtigt ist, es müsse sich das, worauf die Aktivität des Serums und die Fällbarkeit des Extraktes beruhe, im Niederschlage wiederfinden lassen. Nur ist eine Analyse desselben hier nicht wie bei chemischen Reaktionen ohne weiteres möglich.

Der Aktivitätsverlust des Serums ist ein vollkommener, d. h. erstreckt sich auf jede Seite der Serumtätigkeit, und es kommt dabei nur auf die Menge und Stärke des verwendeten Extraktes an.

Die genauere, begreiflicherweise für die Bakteriolyse am leichtesten durchführbare Analyse ergibt, dafs vom Serum der Immunkörper verloren gegangen ist, während das Komplement erhalten und unter besonderen Umständen vollständig nachweisbar bleibt; aus dem Extrakte ist die fällbare Substanz verschwunden und diese beiden Stoffe müssen also in den Niederschlag übergegangen sein, wo sie vermutlich eine neue, weil unlösliche Verbindung bilden. Danach ist die Präzipitation eines Choleraextraktes durch Rinderseren nichts anderes als die unter sinnfälligen Erscheinungen sich vollziehende Verbindung des Serumimmunkörpers mit Cholerasubstanz.

Ein weiterer Versuch lehrt aber, dafs diese Verbindung gewisser Bedingungen zu ihrem Zustandekommen bedarf. Denn wenn man ein Serum erhitzt, so vermag es Choleraextrakt nicht mehr zu verändern, der Immunkörper, der sonst, durch Bakteriolyse nachweisbar, verloren geht, bleibt erhalten und Niederschlagbildung erfolgt auch bei tagelangem Stehen der Proben nicht. Daraus folgt, dafs Serumimmunkörper und Cholerasubstanz nur eine sehr geringe Verwandtschaft zueinander haben und anscheinend unverändert in gelöstem Zustande in derselben Flüssigkeit nebeneinander existieren können. Ihre Vereinigung

bedarf erst eines besonderen Anstofses und diesen liefert ein nur im aktiven Rinderserum befindliches Etwas, das Komplement. Das führt sofort zu Vorstellungen über die Natur des Komplementes, die jedermann geläufig sind. Das Komplement wirkt als Katalysator, der im Sinne Ostwalds eine Reaktion, die sonst nur sehr langsam, oft unmerklich langsam zustandekommt, beschleunigt.

Der einfachste Beweis dafür bestünde darin, dafs man ein Serum, das entweder durch Immunkörper oder durch Komplementverlust unwirksam geworden ist, wieder zu reaktivieren versucht, im ersten Falle durch Zusatz von Immunkörper, im letzten durch den von Komplement. Namentlich der letztere wäre wichtig. Vollständig und sicher ist der Versuch, ein an sich ungeändert bleibendes Gemisch von erhitztem Rinderserum und Choleraextrakt durch Zusatz von Komplement zur Präzipitation zu bringen, noch nicht gelungen. Wohl deshalb, weil das Komplement, das in reinem Zustande für sich allein wirkungslos sein müfste, in dieser Weise nicht herzustellen ist. Zwar findet sich, besonders bei hämolytischen Versuchen, der Ausdruck „Komplementzusatz“ ganz allgemein, aber er ist deswegen nicht richtig. Man kann aus einem Serum den Immunkörper leicht physiologisch rein isolieren, aber nicht das Komplement. Was als solches bezeichnet und angewendet wird, ist immer aktives Serum, d. h. Immunkörper und Komplement. Nimmt man solches von fremden Tieren, so ändert man die Verhältnisse in einer zurzeit noch gar nicht abzuschätzenden Weise und tatsächlich hat sich bisher kein Serum eines Tieres finden lassen, das, ohne selbst zu präzipitieren, ergänzend gewirkt hätte.

Es müssen daher die Beweise für die katalysatorische Natur des Komplementes auf indirektem Wege geführt werden. Dazu kann man sich leicht der Bakteriolyse als Indikator bedienen. Denn es ist ganz zweifellos, dafs derselbe bakteriolytisch wirksame Immunkörper sowohl durch Behandlung eines Rinderserums mit Bakterien wie mit Extrakt entfernt wird; denn in beiden Fällen läfst sich durch Zusatz von inaktivem Immunserum, öfters auch nur von inaktiviertem Rinderserum die

Bakteriolyse wiederherstellen. Das Komplement ist also trotz der stattgehabten Reaktion erhalten geblieben, es ist nicht direkt in dieselbe eingetreten, ein Verhalten, das gerade für katalytisch wirkende Stoffe, für Fermente typisch ist.

Auf diese Weise könnte man auch das Komplement physiologisch rein zu gewinnen versuchen. Denn dieses mufs zurückbleiben, wenn der Immunkörper aus einem Rinderserum durch Behandlung mit Bakterien oder durch Präzipitation mittels Extraktes ausgefällt wird. Für die Bakteriolyse gelingt das ohne weiteres, wie die früher angeführten Beispiele zeigen, für die Agglutination durch normales Rinderserum hat Herr Dr. Braun auf diesem Wege schöne Erfolge erzielt, welche die komplexe Natur der Normalagglutinine beweisen, und es ist zu hoffen, dafs auch die Ergänzung der Präzipitation nur eine Frage der nächsten Zeit sein wird.

Dennoch sind Flüssigkeiten, welche anscheinend nur Komplement enthalten, nichts weniger als rein, und der Grund dieser Unreinheit bildet gleichzeitig den zweiten Beweis für die katalytische Wirkung des Komplements, welcher auf dieser Überlegung beruht. Vorhin wurde gesagt: da der Immunkörper eines erhitzten Serums neben der fällbaren Substanz eines Choleraextraktes anscheinend ohne jede Veränderung existieren und gelöst bleiben kann, so müssen beide Stoffe nur ein sehr geringes Vereinigungsbestreben haben, das erst durch einen Katalysator sozusagen geweckt wird. Jetzt kann man schliefsen: wenn die erst unter katalytischem Einflufs stattfindende Verbindung zwischen Immunkörper und Cholerasubstanz jenen Gesetzen folgt, welche für die Verbindung wenig verwandter Stoffe Geltung haben, so sind sie eben wirklich nur wenig verwandt und wenn das Komplement allein ihre Vereinigung zu bewirken vermag, so ist es ein Katalysator.

Die Verbindungen wenig verwandter Stoffe folgen dem Guldberg-Waageschen Konzentrationsgesetze, wobei die Konstante der Formel, welche das Gesetz ausdrückt, eine endliche Zahl ist. Es müssen daher bei bestimmter Temperatur, bei Erlangung des Gleichgewichtes nebeneinander die fertige Ver-

bindung (das Präzipitat) und die Stoffe, aus denen sie entsteht (Serumimmunkörper und gelöste Bakteriensubstanz) in der Flüssigkeit nachweisbar sein. Dieser Nachweis läfst sich führen, indem man zeigen kann, dafs unter allen Umständen Extrakt in gröfserer oder geringerer Menge nach Beendigung der Präzipitation durch Rinderserum in Lösung geblieben ist. Die Methodik beruht auf folgender Überlegung: Versetzt man Serum mit Choleraextrakt, wartet die vollständige Präzipitation bei 37° ab und entfernt das Präzipitat, so enthält die Flüssigkeit noch die unverbundenen Mengen des Serumimmunkörpers und der Vibrionensubstanz, sowie das Komplement. Letzteres kann man durch Erwärmen auf 60° leicht ausschalten. Die zurückgebliebene, unverbundene Vibrionensubstanz wird dabei nicht nachweisbar verändert und vermag noch die Bakteriolyse eines frischen Kinderserums zu hemmen. Die Hemmung mufs aber viel schwächer sein als die, welche durch die entsprechende Menge eines nicht ausgefällten Extraktes hervorgerufen wird, und aus der Differenz kann man den verloren gegangenen und den noch erhaltenen Teil der Bakteriensubstanz erschliefsen. Den in der Mischung überdies noch vorhandenen Serumimmunkörper kann man ohne jeden Nachteil für das Gelingen des Versuches vernachlässigen. Es empfiehlt sich dagegen nicht, dieselbe auf 70—75° zu erwärmen, wie dies anfänglich öfters versucht wurde, da durch diese Temperatur zwar die Immunkörper des Normalserums meist unwirksam werden, dabei aber auch Veränderungen vorgehen müssen (solche Sera werden an und für sich sehr stark hemmend), die man zurzeit noch nicht beurteilen und abschätzen kann.

I. Es werden hergestellt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| I. | 1 ccm akt. Rinderser. | + 0,25 ccm Extr. | + 0,25 ccm NaCl.-Lös. | 1h 37°. Dabei in I u. II typische Fällung, die durch Zentrifugieren entfernt wird. Die and. Proben bleiben klar. Dann werden alle Flüssigkeiten 1/2h auf 62° erwärmt u. verwendet. |
| II. | » » » | + 0,5 » » | + 0 » » | |
| III. | » » » | + 0 » » | + 0,5 » » | |
| IV. | 1 » Rinderser. 1/2h 62° | + 0,25 » » | + 0,25 » » | |
| V. | » » » | + 0,5 » » | + 0 » » | |
| VI. | » » » | + 0 » » | + 0,5 » » | |
| VII. | 1 » Na Cl-Lös. | + 0,5 » » | | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | akt. Rinderser. | Na-Cl-Lös. | urspr. Extr. | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm + 0,06 ccm | I + 0,24 ccm | = 0,01 ccm | 0 |
| 2. | » » + 0,15 » | » + 0,15 » | 0,025 » | 20 |
| 3. | » » + 0,3 » | » + 0 » | 0,05 » | 928 |
| 4. | » » + 0,03 » | II + 0,27 » | 0,01 » | 0 |
| 5. | » » + 0,075 » | » + 0,28 » | 0,025 » | 63 |
| 6. | » » + 0,15 » | » + 0,15 » | 0,05 » | 3700 |
| 7. | » » + 0,06 » | IV + 0,24 » | | 390 |
| 8. | » » + 0,15 » | » + 0,15 » | | ca. 20 000 |
| 9 | » » + 0,3 » | » + 0,15 » | | ca. 600 000 |
| 10. | » » + 0,03 » | V + 0,27 » | | 264 |
| 11. | » » + 0,075 » | » + 0,23 » | | über 20 000 |
| 12 | » » + 0,15 » | » + 0,15 » | | ∞ |
| 13. | » » + 0,03 » | VII + 0,27 » | | 424 |
| 14. | » » + 0,075 » | » + 0,23 » | | 1856 |
| 15. | » » + 0,15 » | » + 0,15 » | | ca. 20 000 |

Der Zusatz der in die Tabelle nicht aufgenommenen Proben III und VI in der gleichen Menge zu 0,1 ccm aktivem Rinderserum ergab überall Sterilität, das Rinderserum an sich liefs 72 Keime am Leben.

II. Es werden hergestellt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| I. | 1 ccm akt. Rinderser. | + 0,25 ccm Extr. | + 0,75 ccm Na Cl-Lös. | 1h 37°. Die in I, II u. III gebildeten Präzipitate werden abzentrifugiert und alle Proben $^{1}/_{2}$h auf 62° erhitzt. |
| II. | 1 » » » | + 0,5 » » | + 0,5 » » | |
| III. | 1 » » » | + 1 » » | + 0 » » | |
| IV. | 1 » » » | + 0 » » | + 1 » » | |
| V. | 1 » Rinderser. $^{1}/_{2}$h 62° | + 0,25 » » | + 0,75 » » | |
| VI. | 1 » » » | + 0,5 » | + 0,5 » » | |
| VII. | 1 » » » | + 1 » » | + 0 » » | |
| VIII. | 1 » » » | + 0 » » | + 1 » » | |
| IX. | 1 ccm Na Cl-Lös. | + 1 » » | | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | aktives Rinderser. | Na-Cl-Lös. | urspr. Extr. | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 1 ccm + 0,08 ccm | I + 0,32 ccm | = 0,01 ccm | 0 |
| 2. | » + 0,2 » | » + 0,2 » | = 0,025 » | 115 |
| 3. | » + 0,4 » | » + 0 » | = 0,05 » | 104 |
| 4. | » + 0,04 » | II + 0,36 » | = 0,01 » | 0 |
| 5. | » + 0,1 » | » + 0,3 » | = 0,025 » | 408 |
| 6. | » + 0,2 » | » + 0,2 » | = 0,05 » | 2768 |
| 7. | » + 0,4 » | » + 0 » | = 0,1 » | 9600 |
| 8. | » + 0,02 » | III + 0,38 » | = 0,01 » | 0 |
| 9 | » + 0,05 » | » + 0,35 » | = 0,025 » | 224 |
| 10. | » + 0,1 » | » + 0,3 » | = 0,05 » | über 10 000 |
| 11. | » + 0,2 » | » + 0,2 » | = 0,1 » | 32 000 |
| 12. | » + 0,4 » | » + 0 » | = 0,2 » | über 200 000 |
| 13. | » + 0,08 » | V + 0,32 » | = 0,01 » | 616 |

| | aktives Rinderser. | | | Na-Cl Lös. | urspr. Extr. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14. | 0,1 ccm | + 0,2 ccm | V | + 0,2 ccm | = 0,025 ccm | 13 780 |
| 15. | » | + 0,4 » | » | + 0 » | = 0,05 » | ∞ |
| 16. | » | + 0,04 » | VI | + 0,36 » | = 0,01 » | 172 |
| 17. | » | + 0,1 » | » | + 0,3 » | = 0,025 » | ca. 20 000 |
| 18. | » | + 0,2 » | » | + 0,2 » | = 0,05 » | ca. 800 000 |
| 19. | » | + 0,02 » | VII | + 0,38 » | = 0,01 » | 752 |
| 20. | » | + 0,05 » | » | + 0,35 » | = 0,025 » | 19 000 |
| 21. | » | + 0,1 » | » | + 0,3 » | = 0,05 » | 16 000 |
| 22. | » | + 0,02 » | IX | + 0,38 » | = 0,01 » | 1400 |
| 23. | » | + 0,05 » | » | + 0,35 » | = 0,025 » | 11 000 |
| 24. | » | + 0,1 » | » | + 0,3 » | = 0,05 » | ca. 90 000 |
| 25. | » | + 0 | | | | 4 |

Die Serumproben IV und VIII waren ohne merklichen Einfluſs auf die Bakteriolyse.

III. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | 1 ccm Serum | + 0,3 ccm Extrakt | 2 Std 37°, die Fällung abzentrifugiert und 1/2 Std. auf 60° erhitzt. |
| II. | » » | + 0,4 » » | |
| III. | » » | + 0,5 » » | Von Kontrollen seien nur angeführt: |
| IV. | » » | + 0,6 » » | a) 1 ccm Rind. 1/2 Std. 62° + 0,3 ccm Extr. |
| V. | » » | + 0,7 » » | b) » » » » + 0,6 » » |
| VI. | » » | + 0,8 » » | Bei diesen trat keine Präzipitation ein. |
| VII. | » » | + 1 » » | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur. Von den 82 Einsaatproben dieses Versuches sind nur die charakteristischsten wiedergegeben.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm akt. Rinderser. | + 0,43 ccm | v. I | = 0,1 ccm urspr. Extr. | 23 |
| 2. | » » | + 0,65 » | » » | = 0,15 » » | 119 |
| 3. | » » | + 0,14 » | » II | = 0,04 » » | 0 |
| 4. | » » | + 0,28 » | » » | = 0,08 » » | 85 |
| 5. | » » | + 0,35 » | » » | = 0,1 » » | 376 |
| 6. | » » | + 0,12 » | » III | = 0,04 » » | 42 |
| 7. | » » | + 0,18 » | » » | = 0,06 » » | 256 |
| 8. | » » | + 0,24 » | » » | = 0,08 » » | 552 |
| 9. | » » | + 0,081 » | » IV | = 0,03 » » | 7 |
| 10. | » » | + 0,108 » | » » | = 0,04 » » | 736 |
| 11. | » » | + 0,072 » | » V | = 0,03 » » | 23 |
| 12. | » » | + 0,096 » | » » | = 0,04 » » | 760 |
| 13. | » » | + 0,045 » | » VI | = 0,02 » » | 49 |
| 14 | » » | + 0,0675 » | » » | = 0,03 » » | 400 |
| 15. | » » | + 0,09 » | » » | = 0,04 » » | 1440 |
| 16. | » » | + 0,02 » | » VII | = 0,01 » » | 136 |
| 17. | » » | + 0,04 » | » » | = 0,02 » » | 1008 |
| 18. | » » | + 0,06 » | » » | = 0,03 » » | über 20 000 |
| 19. | » » | + 0,043 | Kontrolle a | = 0,01 » » | 180 |
| 20. | » » | + 0,086 » | » | = 0,02 » » | 2720 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 21. | 0,1 ccm akt. Rinderser. | + 0,13 | Kontrolle a = 0,03 ccm. urspr. Extr. | | ü. 20 000 |
| 22. | » » | + 0,027 | » b 0,01 » | » | 118 |
| 23. | » » | + 0,054 | » » = 0,02 » | » | 1468 |
| 24. | » » | + 0,08 | » » = 0,03 » | » | über 10 000 |
| 25. | » » | + 0 | | | 0 |

Alle Proben, die nur inaktives Rinderserum, in der Menge von 0,09 bis 0,65 ccm zugesetzt erhielten, ergaben vollständige Abtötung.

Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | 1 ccm Rinderser. | + 0,25 ccm Extr. | 2 Std. 37°. Die starken Präzipitate werden abzentrifugiert. In der ganz analog angestellten Probe mit inaktivem Rinderserum blieb die Präzipitation aus. Die Proben wurden ½ Std. bei 60° inaktiviert. |
| II. | » » | + 0,5 » » | |
| III. | » » | + 0,75 » » | |
| IV. | » » | + 1 » » | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm akt. Rinderser. | + 0,75 ccm von I | = 0,15 ccm urspr. Extr. | | 1980 |
| 2. | » » » | + 0,12 » » II | = 0,04 » | » | 66 |
| 3. | » » » | + 0,18 » » » | = 0,06 » | » | 272 |
| 4. | » » » | + 0,24 » » » | = 0,08 » | » | 1490 |
| 5. | » » » | + 0,3 » » » | = 0,1 » | » | 2080 |
| 6. | » » » | + 0,045 » » III | = 0,02 » | » | 14 |
| 7. | » » » | + 0,09 » » » | = 0,04 » | » | 206 |
| 8. | » » » | + 0,135 » » » | = 0,06 » | » | 500 |
| 9. | » » » | + 0,18 » » » | = 0,08 » | » | ca. 8000 |
| 10. | » » » | + 0,04 » » IV | = 0,02 » | » | 120 |
| 11. | » » » | + 0,08 » » » | = 0,04 » | » | 1570 |
| 12. | » » » | + 0,12 » » » | = 0,06 » | » | über 10,000 |
| 13. | » » » | + 0,16 » » » | = 0,08 » | » | |

In den Kontrollproben mit inaktivem Rinderserum trat Bakteriolysehemmung überall bei einer 0,02 ccm Extrakt entsprechenden Menge auf. Das Rinderserum allein tötete bis auf 4 Keime ab. Die Zahl für die Probe 1 ist nicht zu verwerten, weil erhitztes Rinderserum in dieser Menge allein diesmal eine Hemmung der Bakteriolyse (0,1 aktives + 0,75 ccm inaktives Rinderserum = 1700 Baz.) zulies.

V. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | 2 ccm Rinderser. | + 0,6 ccm Extr. | Starke rasche Fällungen bei 37°, die abzentrifugiert werden. Die entsprechenden Proben mit inaktivem Rinderserum blieben klar. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben ½ Std. auf 60° erhitzt. |
| II. | » » | + 0,8 » » | |
| III. | » » | + 1 » » | |
| IV. | » » | + 1,2 » » | |
| V. | » » | + 1,4 » » | |
| VI. | » » | + 1,6 » » | |

Einsaat für den bakteriolytischen Teil des Versuches 0,05 ccm Bouillon kultur. Für den hämolytischen wird 1 ccm 10 proz. Kaninchenblut verwendet. (Gesamte Flüssigkeitsmenge 2 ccm.)

| Nr. | akt. Rinderser. | | | | urspr. Extr. | A. Bakteriolyse | B. Hämolyse |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + 0,65 | ccm | von | I = 0,15 ccm | 928 | fast vollständig |
| 2. | » | + 0,21 | » | » | II = 0,06 » | 216 | » |
| 3. | » | + 0,35 | » | » | II = 0,1 » | 135 | » |
| 4. | » | + 0,42 | » | » | » = 0,12 » | 280 | » |
| 5. | » | + 0,12 | » | » | III = 0,04 » | 94 | » |
| 6. | » | + 0,24 | » | » | » = 0,08 » | 560 | stark |
| 7. | » | + 0,3 | » | » | » = 0,1 » | 864 | mäfsig |
| 8. | » | + 0,054 | » | » | IV = 0,02 » | 224 | ziemlich stark |
| 9. | » | + 0,108 | » | » | » = 0,04 » | 132 | |
| 10. | » | + 0,135 | » | » | » = 0,05 » | 3200 | sehr wenig |
| 11. | » | + 0,16 | » | » | » = 0,06 » | 4600 | |
| 12. | » | + 0,048 | » | » | V = 0,02 » | 760 | mäfsig |
| 13. | » | + 0,072 | » | » | » = 0,03 » | 1956 | sehr gering |
| 14. | » | + 0,096 | » | » | » = 0,04 » | 4000 | |
| 15. | » | + 0,0225 | » | » | VI = 0,01 » | 528 | zieml. stark |
| 16. | » | + 0,045 | » | » | » = 0,02 » | 760 | sehr gering |
| 17. | » | + 0,0675 | » | » | » = 0,03 » | 6300 | |

Die Probe mit inaktiviertem Rinderserum hemmte in der 0,01 — 0,02 ccm Extrakt entsprechende mit Keimzahlen von ca. 700—2000. Die Hämolyse wurde durch die 0,01 ccm Extrakt entsprechende Menge stark gehemmt, verstärkte sich aber bei gröfseren Mengen, die mehr inaktives Serum enthielten (siehe weiter unten). Das reine Rinderserum tötete in 0,1 ccm bis auf 2 Keime ab und löste bis auf einen geringen Rest Kaninchenblut auf.

Auf die enorme technische Schwierigkeit solcher Versuche braucht nicht erst hingewiesen zu werden. Der kleinste Fehler kann das ganze Ergebnis illusorisch machen. Dennoch läfst sich durch dieselben sicher erweisen, dafs eine vollständige Extraktausfällung nicht stattfindet.

Die Berechnung derartiger Versuche ist natürlich mangels eines geeigneten Mafsstabes schwierig und nicht ohne Willkürlichkeit durchführbar. Spricht man von Hemmung dann, wenn die Zahl der Keime in der Probe, welche Extrakt enthält, die Zahl der Keime, welche in einer Probe ohne Extrakt vorhanden sind, um das 100fache übersteigt, so läfst sich eine »Extrakteinheit« aufstellen. Als Beispiel sei Versuch II gewählt. Die Hemmung würde von 400 Keimen an zu rechnen sein, die von 0,01 ccm ursprünglichen Extraktes geliefert wird.

In I wird diese Hemmung auch durch die 0,05 ccm des ursprünglichen Extraktes enthaltende Menge nicht erreicht. Zugesetzt waren zu 1 ccm Serum 0,25 cm Extrakt, also 25 Einheiten. Von diesen sind mindestens 5 verloren, erhalten?

In II und III tritt Hemmg. zwisch. 0,025 u. 0,05 ccm der urspr. Extr.-Menge ein, } somit ungefähr gleichviel Extrakt erhalten und verloren.

Im Beispiel III würde Hemmung bei einer Keimzahl von 100 erreicht sein, was durch 0,01 ccm unausgefällten Extraktes erreicht wird. Diese Hemmung tritt bei Probe I erst ein nach Zusatz einer Menge, welche 0,15 ccm des ursprünglichen Extraktes enthält.

Während also normalerweise 0,01 ccm die Hemmungs- oder Extrakteinheit darstellt (= 1), ist diese jetzt = 15. Für Probe II gilt die Zahl 10, für III 6, für IV 4, für V ebenfalls 4, für VI 3, für VII ungefähr 1. Da für I 15 Einheiten erst die Hemmung geben, wie sonst eine Einheit, so wurden verloren 15—1 = 14 Einheiten. Da 30 Einheiten zu 1 ccm Serum zugesetzt wurden, so sind ca. 28 Einheiten verloren gegangen u. 2 erhalten geblieben

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| für | II | » | » | » | 36 | » | » | » | 4 | » | »
| » | III | » | » | » | 41 | » | » | » | 9 | » | » |
| » | IV | » | » | » | 45 | » | » | » | 15 | » | » |
| » | V | » | » | » | 52 | » | » | » | 18 | » | » |
| » | VI | » | » | » | 53 | » | » | » | 27 | » | » |
| » | VII | » | » | » | 50 | » | » | » | 50 | » | » |

(nur wahrscheinlich.)

Von der eingehenden Besprechung und Berechnung der auf diese Weise angestellten Versuche wurde schliefslich nach reiflicher Überlegung Abstand genommen, da der Einwand einer willkürlichen Berechnung schwer abzuweisen ist. Denn man kann auf die Unsicherheit der bakteriolytischen Methode überhaupt hinweisen, sobald sie mit absoluten Zahlen zu rechnen hat. Es kann ganz gut ein Serum die gleiche bakteriolytische Wirkung haben wie ein zweites, obwohl das eine bei gleicher Einsaat nach 4 Std. keine, das andere 50 oder mehr Kolonien auf der Platte liefert. Hier könnte nur eine gröfsere Anzahl gleichzeitig angelegter Versuchsproben helfen, was aber eine Versuchsausdehnung bedingen würde, die jede Arbeitskraft übersteigt.

Es mufs vorläufig genügen, festgestellt zu haben, dafs tatsächlich eine vollständige Ausfällung des Extraktes mit Serum nicht gelingt, dafs immer ein Rest von Vibrionensubstanz, im Serum gelöst, zurückbleibt. Der Rest ist um so geringer, je kleiner die Menge des ursprünglich zugesetzten Extraktes war, steigt aber bei stärkerem Zusatz rasch an. Von einem gewissen Quantum Extraktes an wird von einem bestimmten Serum immer nur eine bestimmte Menge ausgefällt.

Diese Menge schwankt bei verschiedenen Versuchen etwas, was offenbar mit der stets wechselnden präzipitierenden Kraft des Serums und der

Ungleichheit der Extrakte zusammenhängt. Während sie im Versuchsbeispiel III etwa 45—50 Extrakteinheiten beträgt, wurde im folgenden um etwa die Hälfte durch das Serum bewilligt.

IV. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. 1 ccm akt. Ser. | + 0,3 ccm Extr. | + 0,7 ccm Na Cl-Lös. | Die in I—IV entstandenen Präzipitate werden abzentrifugiert u. die klaren Flüssigkeiten $^1/_2$ Std. auf 62° erhitzt. |
| II. » » » | + 0,4 » » | + 0,6 » » | |
| III. » » » | + 0,5 » » | + 0,5 » » | |
| IV. » » » | + 0,6 » » | + 0,4 » » | |
| V. » » » | + 0 » » | + 1 » » | |
| VI. 1 » Ser. $^1/_2$h 62° | + 0,6 » » | + 0,4 » » | |

| | aktives Rinderser. | Na Cl-Lös. | urspr. Extr. | Bakteriolyse | Hämolyse in 50% Kaninchenblut. |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + 0,2 ccm | | 17 | vollständig |
| 2. | » | + 0,2 » | von I = 0,03 ccm | 106 | sehr stark |
| 3. | » | + 0,1 » | » II = 0,02 » | 304 | » |
| 4. | » | + 0,2 » | » » = 0,04 » | 1460 | stark |
| 5. | » | + 0,08 » | » III = 0,02 » | 1288 | » |
| 6. | » | + 0,12 » | » » = 0,03 » | 1256 | mäfsig |
| 7. | » | + 0,2 » | » » = 0,04 » | ca. 5000 | wenig |
| 8. | » | + 0,066 » | » IV = 0,02 » | 1664 | » |
| 9. | » | + 0,1 » | » » = 0,03 » | 3080 | fast keine |
| 10. | » | + 0,13 » | » » = 0,04 » | über 5000 | fast keine |
| 11. | » | + 0,2 » | » V | 0 | vollständig |
| 12. | » | + 0,033 » | » VI = 0,01 » | 1380 | wenig |
| 13. | » | + 0,066 » | » » = 0,02 » | über 5000 | keine |

Wie im Beispiel III berechnet, würde Hemmung der Bakteriolyse bei etwa 1700 Keimen beginnen.

Die Hemmung durch unveränderten Extrakt beginnt bei etwas mehr als 0,01 ccm, welche Menge als Einheit zu gelten hätte. Dann kommt II in etwas mehr als 0,04 ccm des ursprünglichen Extraktes, es sind also 4—1 ist 3 Einheiten verloren, für die in II enthalten gewesene Extraktmenge sind also $4 : 3 = 40 : X$; $X = 30$ Extrakteinheiten verloren.

Für III ist Hemmung durch 0,03—0,04 ccm ursprünglichen Extraktes gegeben. Von der zugesetzten Extraktmenge sind also 33—37$^1/_2$ Einheiten verloren.

Für IV ist Hemmung durch 0,02 (wenig mehr) ursprünglichen Extraktes gegeben. Von der zugesetzten Extraktmenge also 30 Einheiten verloren.

V. Eine etwas modifizierte Methode besteht darin, kleine Mengen von aktivem Rinderserum mit kleinen Extraktmengen zu versetzen, das Entstehen der Präzipitation abzuwarten und dann durch Zusatz frischen aktiven Serums zu untersuchen, welche Probe noch genügend Extrakt zur Bakteriolysehemmung enthält.

Die Proben 1—8 enthalten je 0,1 ccm aktives Rinderserum, denen die verzeichnete Extraktmenge unverdünnt zugesetzt wird. Während 1 Std. Aufenthaltes bei 37° entsteht Trübung und Fällung. Darauf wird Na Cl-Lösung zugesetzt und noch $^1/_2$ Std. gewartet. Schliefslich werden alle

Proben (ohne Entfernung der gebildeten Präzipitate) $^{1}/_{2}$ Std. auf 62° erhitzt und aktives Serum zugesetzt, worauf sofort die Einsaat von 0,05 ccm Bouillonkultur erfolgt.

| | Serum | | Extrakt | | Na Cl-Lös. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + | 0,01 ccm | + | 0,09 ccm | | 37 |
| 2. | » | + | 0,02 » | + | 0,08 » | Nach erfolgter Präzipitation | 320 |
| 3. | » | + | 0,03 » | + | 0,07 » | und $^{1}/_{2}$ std. Erhitzung auf | 202 |
| 4. | » | + | 0,04 » | + | 0,06 » | 62° wird überall 0,1 ccm | 1760 |
| 5. | » | + | 0,06 » | + | 0,04 » | aktives Rinderserum zu- | 8200 |
| 6. | » | + | 0,08 » | + | 0,02 » | gesetzt. | über 20 000 |
| 7. | » | + | 0,1 » | + | θ » | | desgl. |
| 8. | » | + | θ » | + | 0,1 » | | θ |

VI. Anordnung genau wie im vorigen Versuche.

| | Serum | | Extrakt | | Na Cl-Lös. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,1 ccm | + | 0,005 ccm. | + | 0,095 ccm | | θ |
| 2. | » | + | 0,01 » | + | 0,09 » | Nach erfolgter Präzipitation | θ |
| 3. | » | + | 0,02 » | + | 0,08 » | und $^{1}/_{2}$ std. Erhitzung auf | 248 |
| 4. | » | + | 0,03 » | + | 0,07 » | 62° wird überall 0,1 ccm | 220 |
| 5. | » | + | 0,04 » | + | 0,06 » | aktives Rinderserum zu- | 856 |
| 6. | » | + | 0,05 » | + | 0,05 » | gesetzt. | 3800 |
| 7. | » | + | 0,06 » | + | 0,04 » | | über 10 000 |
| 8. | » | + | θ » | + | 0,1 » | | θ |

Auch in dieser Versuchsanordnung tritt das, was bewiesen werden soll, klar hervor, nämlich dafs durch die Präzipitation zwar die bakteriolysehemmende Wirkung der gelösten Cholerasubstanz zerstört wird, dafs aber ein Rest davon hartnäckig erhalten bleibt und sich, aufser in Versuchen mit kleinsten Extraktmengen, noch nachweisen läfst. Die Verfasser betonen dabei wiederholt ausdrücklich, dafs sie sich der blofs relativen Genauigkeit der Versuche vollkommen bewufst sind. Die Schwierigkeiten liegen teils in dem zu bearbeitenden Materiale (lebende Bazillen!), teils in der Methodik, teils in der Berechnung der erhaltenen Resultate, bei der es ohne Willkür nicht vollständig abgehen kann. Ob sich diese in Zukunft werden beheben lassen, mufs fraglich erscheinen. Vielleicht gibt die Verwendung der Hämolyse mit Bemessung der Stärke derselben aus dem gelösten Blutfarbstoffe, eine Methode die Arrhenius in seiner Immunochemie zu exakten Messungen viel benutzen konnte, sicherere Resultate, die auch leichter zu erlangen sein dürften. Viel Übung gehört jedenfalls auch dazu und ganz

ohne Willkürlichkeit, z. B. in der Bestimmung eines Hemmungsbeginnes, dürfte es auch dabei nicht abgehen. Brauchbar ist jedenfalls auch die hämolytische statt der bakteriolytischen Methode. Für etwaige von anderer Seite vorzunehmende Versuche in dieser Richtung seien einige Grundlagen angegeben. Denn auch die hämolytische Kraft des normalen Rinderserums wird durch Choleraextrakt gehemmt, dieselbe geht durch Präzipitation verloren und zwar durch Verminderung des Immunkörpers, der sich hier ganz leicht durch inaktiviertes Rinderserum wieder ersetzen läfst.

I. 10% Kaninchenblut, sämtliche Proben werden mit Kochsalzlösung auf 2 ccm aufgefüllt.

Der Versuch dient gleichzeitig zur Feststellung, wie sich die extrabierten Bazillen und der aus ihnen gewonnene Extrakt in Bezug auf die Hemmung von Bakteriolyse und Hämolyse verhalten. Zu diesem Zwecke wird die Kulturmasse einer Kolleschen Schale mit 20 ccm Wasser 1 Std. bei 56 bis 60° erhitzt. 3 ccm davon werden als Extrakt III unverändert verwendet (also Extrakt und Bazillenreste), 3 ccm werden vollständig klar zentrifugiert (Extrakt I, nur gelöste Substanz enthaltend), der Satz wird in 3 ccm Na Cl-Lösung als Extrakt II sorgfältig aufgeschwemmt. Der Teil a des Versuches wurde so angestellt, dafs rote Blutkörperchen und Extrakt gleichzeitig dem Serum zugesetzt wurden, während im Teil b der Zusatz der Blutkörperchen erst nach 1 stdg. Stehen der Extraktserummischungen bei 37° (Präzipitation) erfolgte.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| a) 0,15 ccm akt. Rinderser. | + 0,001 | 0,005 | 0,01 | 0,05 | 0,1 ccm | Extr. I |
| | vollständig | vollst. | vollst. | vollst. aber mit zeitl., Hemmung. | | |
| » » » | + 0,001 | 0,005 | 0,01 | 0,05 | 0,1 ccm | Extr. II |
| | vollständig | vollst. | vollst. | vollst. mit zeitlicher Hemmung. | | |
| » » » | + 0,001 | 0,005 | 0,01 | 0,05 | 0,1 ccm | Extr. III |
| | vollständig | vollst. | vollst. | vollst. u. | fast vollst. mit zeitl. Hemmung. | |

b) Es werden hergestellt:

1. 1 ccm Rinderserum + 0,01 ccm Extrakt I
2. » » + 0,05 » »
3. » » + 0,1 » »
4. » » + 0,2 » »

5—8 ebenso mit Extrakt II
9—12 » » » III
13. 1 ccm Rinderserum + 0,2 ccm Na Cl-Lösg.

Nach 1 Std. Stehen bei 37° verwendet. Alle Proben werden auf 1,2 ccm mit Na Cl-Lösung aufgefüllt.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 0,18 ccm von | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | stark = 80 | deutlich = 30 | minimal < 5 | 0 |
| » » | 5 | 6 | 7 | 8 |
| | stark = 80 | deutlich = 30—25 | minimal < 5 | 0 |
| » » | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | deutlich = 30 | 0 | 0 | 0 |

Die Lösung durch Probe 13 ist vollständig = 100. Die beigesetzten Zahlen beim Versuchsresultate von 1—12 bedeuten die relative Stärke der Lösungen im Vergleich zu 13, kolorimetrisch nach der Stärke der Rötung der Flüssigkeiten bestimmt. Um zu zeigen, dafs sich die Bakteriolyse des normalen Rinderserums im Prinzip genau so wie die Hämolyse verhält und ebenso beeinflufst wird, seien die Zahlen des mit den gleichen Flüssigkeiten angestellten bakteriolytischen Versuches (Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur) angeführt.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a) 0,1 ccm akt. Rinderser. | + 0,001 | 0,003 | 0,005 | 0,007 | 0,01 | 0,015 | ccm Extr. I |
| | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 | 528 | |
| » » » | + 0,001 | 0,003 | 0,005 | 0,007 | 0,01 | 0,015 | » » II |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 632 | 1840 | |
| » » » | + 0,001 | 0,003 | 0,005 | 0,007 | 0,01 | 0,015 | » » III |
| | 0 | 0 | 83 | 716 | 2600 | ∞ | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| b) 0,12 ccm von | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| | 0 | 1456 | 8—10 000 | | |
| » » | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| | 0 | 118 | 980 | ca. 4000 | |
| » » | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| | 20 | 2300 | ∞ | ∞ | 0 |

II. Es werden hergestellt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Serum I : 2 ccm akt. Rinderser. | + 0,1 ccm Extr. | + 0,9 Na Cl-Lös. | | 1 Std. 37°. Die in 1—IV entstandenen mächtigen Fällungen werden abzentrifugiert. |
| » II : » » » | + 0,2 » » | + 0,8 | » | |
| » III: » » » | + 0,5 » » | + 0,5 | » | |
| » IV: » » » | + 1 » » | + 0 | » | |
| » V : » » » | + 0 » » | + 1 | » | |

10% Kaninchenblut in 2 ccm Gesamtflüssigkeit

| | + 0,3 ccm v. I | + 0,3 ccm v. II | |
|---|---|---|---|
| 0,7 ccm Na Cl-Lösung | vollständig | vollst. mit sehr starker zeitlicher Hemmung | |
| Na Cl-Lös. Rinderser. | | | |
| 0,6 ccm + 0,1 ccm ½ Std. 56° | vollständig | vollständig, kaum eine zeitliche Hemmung. | |
| 0,5 » + 0,2 » » | | | |
| 0,2 » + 0,5 » » | | | |
| | + 0,3 ccm v. III | + 0,3 ccm v. IV | + 0,3 v. V |
| 0,7 ccm Na Cl-Lösung | wenig Lösung | keine Lösung | |
| Na Cl-Lös. Rinderser. | | | |
| 0,6 ccm + 0,1 ccm ½ Std. 56° | vollständig mit zeit. Hemmung | vollständig mit zeit. Hemmung | vollständig |
| 0,5 » + 0,2 » » | | | |
| 0,2 » + 0,5 » » | | | |

Das inaktivierte Rinderserum allein zeigte in keiner Menge auch nur spurenweise Lösung.

Es unterliegt keinem Zweifel, dafs auch die normale Hämolyse des Rinderserums durch die gelöste Cholerasubstanz genau so wie die Bakteriolyse beeinflufst wird, und dafs man sich dieser

Methode zur Erkennung der Gesetzmäfsigkeiten der Serumaktivität bedienen kann. Im allgemeinen scheint aber die bakteriolytische Methode empfindlicher zu sein, obwohl sie weit schwieriger zu handhaben ist.

Ein Hilfsmittel für die Bestimmung des Verhaltens des Serumimmunkörpers während und nach einer Präzipitation von gelöster Cholerasubstanz bietet folgende Überlegung. Es wurde gezeigt, dafs der Immunkörper durch die Präzipitation verloren geht. Anderseits liefs sich feststellen, dafs man zur Hemmung der Bakteriolyse eines Rinderserums um so mehr Extrakt braucht, je immunkörperreicher das betreffende Serum ist. Wird also in einem Serum ein Teil des ursprünglichen Immunkörpers durch Präzipitation entfernt, so bedarf man zur Hemmung der noch rückbleibenden Bakteriolyse dann viel weniger Extrakt als im unveränderten Serum. Aus der Differenz kann man einen Schlufs auf die Menge des in Verlust geratenen Immunkörpers ziehen. Natürlich wird man auch hier nur sehr relativ gültige Werte erwarten dürfen, schon deshalb, weil ein der Präzipitation unterworfenes Serum immer noch unausgefällte Extraktmengen enthalten mufs. Deshalb darf man natürlich nur mit sehr kleinen Quantitäten arbeiten.

I. Es werden hergestellt:

| | | |
|---|---|---|
| Serum I : 2 ccm Rinderser. | + 0,01 ccm Extrakt | Die überall auf 2,2 ccm Gesamtflüssigkeit aufgefüllten Proben bleiben 1 Std. bei 37°. In III und IV entstehen Fällungen, in I und II Trübungen. Dann wird zentrifugiert. |
| » II : » » | + 0,02 » » | |
| » III : » » | + 0,1 » » | |
| » IV : » » | + 0,2 » » | |
| » V : » » | + 0,2 ccm Na Cl-Lös. | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur, nachdem die Mischungen von Serum und Extrakt erst 1/2 Std. bei 37° gestanden waren.

| | + 0,11 ccm von I | + 0,11 ccm von II | + 0,11 ccm von III |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 0 | 0 | 10 |
| 0,0005 ccm Extrakt | 0 | 0 | 39 |
| 0,001 » » | 0 | 0 | 47 |
| 0,003 » » | 0 | 0 | 110 |
| 0,005 » » | 0 | 2 | 424 |
| 0,007 » » | 62 | 9 | 1280 |
| 0,01 » » | 56 | 256 | über 10 000 |

| | + 0,11 ccm von IV | + 0,11 ccm von V |
|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 480 | 0 |
| 0,0005 ccm Extrakt | 392 | 0 |
| 0,001 » » | 3680 | 0 |
| 0,003 » » | 3590 | 0 |
| 0,005 » » | 6200 | 0 |
| 0,007 » » | über 10 000 | 0 |
| 0,01 » » | über 10 000 | 312 |

II. Es werden hergestellt:

| | | |
|---|---|---|
| Serum I : 2 ccm Rinderser. | + 0,04 ccm Extrakt | 2 Std. 37°. Dabei ist in I die Trübung erst im Beginne der Ausflockung, die übrigen Proben sind präzipitiert. Die Niederschläge werden durch Zentrifugieren entfernt. Alle Proben sind durch Na Cl-Lösung auf das Volumen von 2,2 ccm aufgefüllt. |
| » II : » » | + 0,06 » » | |
| » III: » » | + 0,08 » » | |
| » IV: » » | + 0,12 » » | |
| » V : » » | + 0,2 ccm Na Cl-Lös. | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur, wie bei Versuchsbeispiel I.

| | + 0,11 ccm von I | + 0,11 ccm von II | + 0,11 ccm von III |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 3 | 0 | 9 |
| 0,001 ccm Extrakt | 17 | 384 | 1028 |
| 0,003 » » | 336 | 544 | ca. 5000 |
| 0,006 » » | ca. 3000 | über 10 000 | über 10 000 |
| 0,009 » » | ∞ | ∞ | ∞ |
| 0,012 » » | ∞ | ∞ | ∞ |

| | + 0,11 ccm von IV | + 0,11 ccm von V |
|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 1860 | 0 |
| 0,001 ccm Extrakt | ca. 4000 | 0 |
| 0,003 » » | über 10 000 | 0 |
| 0,006 » » | über 10 000 | 102 |
| 0,009 » » | ∞ | 560 |
| 0,012 » » | ∞ | über 20,000 |

III. Es werden hergestellt:

| | | |
|---|---|---|
| Serum I : 1,5 ccm Rinderser. | + 0,05 ccm Extrakt | Die während 2 std. Aufenthaltes bei 37° entstandenen Präzipitate werden abzentrifugiert. Alle Proben sind auf 2 ccm Gesamtvolumen gebracht. |
| » II : » » | + 0,075 » » | |
| » III: » » | + 0,1 » » | |
| » IV: » » | + 0,5 ccm NaCl-Lös. | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur, wie bei Versuchsbeispiel I.

| | + 0,13 ccm v. I | + 0,13 ccm v. II | + 0,13 ccm v. III | + 0,13 ccm v. IV |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 14 | 120 | 62 | 1 |
| 0,001 ccm Extr. | 1230 | 4700 | 3600 | 0 |
| 0,0025 » » | 2728 | über 10 000 | über 10 000 | 0 |
| 0,005 » » | ca. 10 000 | ∞ | ∞ | 72 |
| 0,0075 » » | ∞ | ∞ | ∞ | ca. 2000 |
| 0,01 » » | ∞ | ∞ | ∞ | ca. 8000 |

Es fällt sofort auf, dafs Sera, die mit kleinen Mengen Extraktes ausgefällt sind, in bezug auf die absolute Bakteriolyse ganz unverändert erscheinen. Es besteht hierin kaum ein Unterschied zwischen den Seren I, II, III der angeführten Versuchsbeispiele. Die tiefgehende Veränderung, die sie dennoch erlitten haben, gibt sich erst durch Zusatz von Extrakt in Mengen zu erkennen, welche ein normales Serum noch ganz unbeeinflufst lassen. Da nun, wie die früheren Versuche beweisen, der Extrakt nur auf den Immunkörper des Rinderserums wirkt, mufs dieser verloren gegangen sein und die Gröfse des Verlustes läfst sich ungefähr berechnen.

Die angeführten drei Versuchsbeispiele betreffen offenbar verschieden stark bakterizid wirksame, d. h. verschieden immunkörperreiche Sera. Am reichsten daran ist das Serum im Beispiel 1, am ärmsten in III. Berechnet man das in der Mitte liegende Serum des Versuchsbeispieles II, so ergibt sich:

0,1 ccm des unveränderten Serums V wird gehemmt durch 0,006—0,009 ccm Extrakt. Ungefähr die gleiche Bakterienzahl gibt das Serum I bei Zusatz von nur 0,003—0,006 ccm Extrakt, d. h. es bedarf zur gleichen Bakteriolysierung um 0,003 ccm Extrakt weniger. Bei Serum II tritt entsprechend die Hemmung der Bakteriolyse schon bei 0,001 ccm Extrakt ein, die Differenz der Extraktmenge beträgt also mindestens 0,005 ccm, noch gröfser ist die Differenz in Serum III, und Serum IV hat an sich, ohne neuerlichen Extraktzusatz, schon soviel von der bakteriolytischen Kraft verloren, wie es im normalen Serum erst durch 0,006—0,009 ccm Extraktzusatz zu erreichen ist. Hätte man eine Immunkörpereinheit, die man auf eine beliebige Extrakteinheit einstellen könnte, so wäre es möglich den Immunkörperverlust zahlenmäfsig, wenn auch nur relativ auszudrücken. Wäre z. B. die Einheit des Extraktes diejenige Menge davon, welche 0,1 ccm Rinderserum nach erfolgter Präzipitation bakteriolytisch unwirksam macht, so stellt 0,1 ccm Serum die Immunkörpereinheit dar, die man in 100 Teile zerlegen könnte. Das tritt z. B. im I. Beispiel bei 0,01 ccm Extrakt ein und entspricht also 1 Extrakteinheit 100 Immunkörpereinheiten. Nach Behandlung des Serums mit 0,1 ccm Extrakt für 2 ccm wird die gleiche Bakteriolysehemmung die im unveränderten Serum durch 0,01 Extrakt erfolgt, schon durch 0,003 bis 0,005 ccm, rund durch 0,004 ccm herbeigeführt. Da 0,01 ccm Extrakt 100 Einheiten hemmen, so hemmen 0,004 ccm noch 40 Immunkörpereinheiten, die also nach Ausfällung mit 0,1 ccm Extrakt für 2 ccm Serum in diesem noch vorhanden sind.

Man kann bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Versuche noch eine andere Berechnungsart anwenden, die in vielen, aber nicht allen Fällen interessante Aufschlüsse liefert. So wird im I. Versuchsbeispiel die Bakteriolyse des normalen Serums erst bei Zusatz von 0,01 ccm Extrakt gehemmt. In Serum III (die Seren I und II fallen aufser Betracht, weil der Extrakt-

zusatz keinen merklichen Effekt hervorbrachte) tritt eine analoge Hemmung schon bei Zusatz von 0,005 ccm Extrakt ein. Dieses Serum war aber mit 0,1 ccm Extrakt für 2 ccm, also 0,005 für 0,1 ccm ausgefüllt. 0,005 + 0,005 ccm gibt aber 0,01 ccm, also jene Extraktmenge, welche normales Serum hemmt. Das Serum IV war mit 0,2 ccm Extrakt für 2 ccm, also mit 0,01 ccm für 0,1 ccm ausgefüllt, mufs also schon jenen Verlust erlitten haben, den bei dem Normalserum V den Zusatz von 0,01 ccm hervorbringt, und tatsächlich ist dieses Serum schon an sich bakteriolytisch gehemmt. Im Versuchsbeispiel II ergäbe eine ähnliche Berechnung: Hemmung des normalen Serums V durch 0,006—0,009 ccm Extrakt, im runden Mittel also 0,0075 ccm. Das Serum I wurde pro 0,1 ccm mit 0,002 ccm Extrakt ausgefüllt, gehemmt wird es durch etwas mehr als 0,003 ccm Extrakt, die Summe gibt 0,005. Für Serum II. ergibt sich 0,003 + 0,003 = 0,006 ccm, für Serum III 0,004 + 0,001 = 0,005 ccm. Das Serum IV enthält schon an sich 0,006 ccm Extrakt und ist von vornherein gehemmt.

Für das immunkörperarme Serum des III. Versuchsbeispieles läfst sich diese Rechnung allerdings nicht durchführen, trifft sie aber auch nur im allgemeinen zu, so ist doch bewiesen, dafs eine vollkommene Gesetzmäfsigkeit besteht, deren Auffindung durch die enormen Schwierigkeiten der Versuche und ihrer Beurteilung allerdings höchst mühsam ist.

Den deutlichsten Beweis dafür, dafs der Immunkörper durch die Präzipitation zwar sehr stark vermindert wird, dafs er aber doch nicht vollständig schwindet, liefert die Tatsache, dafs auch dann, wenn die Bakteriolyse eines Serums durch Präzipitation so gut wie verschwunden ist, ein Zusatz geringer Extraktmengen eine weitere Verschlechterung der noch spurenweise vorhandenen Serumaktivität mit sich bringt.

Aufser Versuchen, die schon zu anderen Zwecken mitgeteilt sind, seien hierfür auszugsweise noch einige Beispiele angeführt.

I. Es werden hergestellt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Serum I: | 1 ccm aktives Rinderserum | + 0,05 ccm Extrakt | Die Präzipitation der auf das Gesamtvolumen 1,2 ccm Flüssigkeit aufgefüllten Probe wird abgewartet. Die durch Zentrifugieren geklärten Sera werden verwendet. |
| » II: | » » » | + 0,075 » » | |
| » III: | » » » | + 0,1 » » | |
| » IV: | » » » | + 0,15 » » | |
| » V: | » » » | + 0,2 » » | |
| » VI: | » » » | + 0,2 Na Cl-Lös. | |

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur nach 1/2 Std. Stehen der Mischungen bei 37°.

| | Serum I + 0,12 ccm | Serum II + 0,12 ccm | Serum III + 0,12 ccm | Serum IV + 0,12 ccm | Serum V + 0,12 ccm | Serum VI + 0,12 ccm |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 Na-Cl-Lös. | 32 | 1168 | 1432 | ca. 3000 | ca. 10 000 | 0 |
| 0,001 ccm Extr. | 720 | ca. 9000 | üb. 10 000 | ∞ | ∞ | 0 |
| 0,005 ccm » | 1928 | üb. 20 000 | ∞ | ∞ | ∞ | 432 |
| 0,01 ccm » | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 11 300 |
| 0,05 ccm » | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | üb. 30 000 |

II. Es wurden hergestellt:

| | | |
|---|---|---|
| Serum I: 1 ccm akt. Rinderserum + 0,06 ccm Extrakt | | Die Präzipitate der auf 1,5 ccm aufgefüllten Probe werdenabzentrifugiert. Einsaat wie im Versuchsbeispiel I. |
| » II: 1 » » » + 0,09 » » | | |
| » III: 1 » » » + 0,12 » » | | |
| » IV: 1 » » » + 0,15 » » | | |
| » V: 1 » » » + 0,5 » Na-Cl-Lös. | | |

| | Serum I + 0,15 ccm | Serum II + 0,15 ccm | Serum III + 0,15 ccm | Serum IV + 0,15 ccm | Serum V + 0,15 ccm |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 0 | 632 | 1720 | ca. 2500 | 0 |
| 0,0005 » Extrakt | 14 | 592 | ca. 3000 | ∞ | 0 |
| 0,001 » » | 2200 | ca. 10 000 | ∞ | ∞ | 0 |
| 0,005 » » | ca. 9000 | ∞ | ∞ | ∞ | 63 |
| 0,01 » » | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ | 1820 |

III. Es wurden hergestellt:

| | |
|---|---|
| Serum I: 1 ccm Serum + 0,01 ccm Extrakt | Anordnung wie in den bisher angeführt. Versuchsbeispielen |
| » II: 1 » » + 0,05 » » | |
| » III: 1 » » + 0,1 » » | |
| » IV: 1 » » + 0.1 » Na Cl-Lös. | |

| | Serum I + 0,11 ccm | II + 0,11 ccm | III + 0,11 ccm | IV + 0,11 ccm |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 162 | 360 | 2120 | 0 |
| 0,001 ccm Extrakt | 218 | 408 | 3080 | 15 |
| 0,0025 » » | 732 | üb. 10 000 (0,0025–0,01) | üb. 10 000 (0,0025–0,01) | 89' |
| 0,005 » » | ca. 1000 | | | 1472 |
| 0,0075 » » | üb. 10 000 (0,0075–0,01) | | | 2000 |
| 0,01 » » | | | | ca. 3000 |

Um zu sehen, wieviel noch wirksamer Extrakt in den Proben I—VI übrig ist, wird angestellt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm aktives Rinderserum + 0,11 ccm Serum | I $^{1}/_{2}$ Std. | 56° | 0 |
| 0,1 » » » + 0,11 » » | II $^{1}/_{2}$ » | 56° | 34 |
| 0,1 » » » + 0,11 » » | III $^{1}/_{2}$ » | 56° | üb. 2000 |
| 0,1 » » » + 0,11 » » | IV $^{1}/_{2}$ » | 56° | 78 |

Es kann als bewiesen gelten, dafs die Aktivität des Rinderserums gegen gelöste Cholerasubstanz, die sich als Präzipitation sinnfällig äufsert, nichts anderes ist als eine Fällungsreaktion, die sich zwischen einem als Immunkörper bezeichneten Bestand-

teile des Serums und der im Choleraextrakte gelösten Leibessubstanz von Vibrionen abspielt. Ihre Besonderheit erhält sie nur durch die geringe Verwandtschaft, das sehr träge Vereinigungsbestreben dieser beiden Stoffe, welche normalerweise das Eingreifen eines Fermentes, des sogenannten Komplementes notwendig macht. Zur Annahme eigener fällender Stoffe, der Präzipitine im Serum, liegt kein Grund vor; das was an der gelösten Cholerasubstanz geschieht, ist nur ein besonderer Fall, eine bestimmte Äufserung der allgemeinen Serumaktivität, die ihr besonderes Gepräge nur durch die Form erhält, in welcher der eine reagierende Körper, die Bakteriensubstanz vorliegt.

Ist diese nicht in gelöstem Zustande vorhanden, wie im Choleraextrakte, sondern mufs das Serum auf morphologisch determinierte Cholerasubstanz, also auf Vibrionen einwirken, so ereignet sich ebenfalls nicht mehr als wieder die Verbindung von Serumimmunkörper und Leibessubstanz der Bakterien; nur die äufsere Form des Geschehens ist eine andere und wird als Bakteriolyse bezeichnet. Man weifs nur äufserst wenig darüber, in welchem physikalischen, geschweige denn chemischen Zustande die Leibessubstanz von Bakterien innerhalb ihrer determinierten Form vorliegt und hat daher ziemliche Freiheit, sich Vorstellungen darüber zu machen. Aber ob nun eine dichtere Hülle die halbflüssige Vibrionensubstanz einschliefst oder ob der ganze Vibrio nichts anderes ist als eine innerhalb eines bestimmten Raumes verdichtete Stoffanhäufung, also wenn das Wort erlaubt ist, ein durch vitale Kräfte kondensierter und so erhaltener Choleraextrakt, sobald ein Serum durch seine Aktivität die Möglichkeit erlangt, seinen Immunkörper mit der Bazillensubstanz zu vereinigen, entsteht Fällung unter der besonderen Form der Granulabildung, der Vibriolyse. Es gibt nichts bei der mikroskopischen Beobachtung der im Reagenzglase stattfindenden Bakteriolyse, was dieser Auffassung widersprechen würde: die Granulabildung ist nichts anderes als ein Verschwinden der ursprünglichen Vibrionenform unter Bildung eines oder mehrerer Ballen einer neuartigen Substanz, die nicht mehr der ursprüngliche Cholerastoff ist, sondern eine Verbindung

desselben mit gewissen Anteilen des Serums. Um ein Schlagwort zu gebrauchen, ist die Bakteriolyse nichts anderes als eine im Bazillenleibe selbst stattfindende Präzipitation.

Dafs die präzipitierende und die bakteriolytische Serumwirkung eine und dieselbe Fähigkeit des Serums sind, ist fast in jedem der vorher mitgeteilten Versuche bewiesen. Es seien die wichtigsten dafür sprechenden Momente noch einmal kurz zusammengefafst:

1. Sowohl die präzipitierende als die bakteriolytische Serumwirkung gehen bei Erhitzung verloren, die Sera lassen sich inaktivieren. Die Inaktivierung ist für beide Fähigkeiten innerhalb gewisser Temperaturgrenzen eine nur relative und erfolgt für die präzipitierende nur etwas später.
2. Beide Serumwirkungen werden durch Behandlung des Serums mit lebenden Vibrionen vernichtet.
3. Dasselbe tritt ein bei Anwendung gelöster Vibrionensubstanz in Form von Choleraextrakten.
4. Es läfst sich nachweisen, dafs sowohl die Verwendung geformter wie gelöster Cholerasubstanz einen Verlust der Immunkörper des Serums mit sich bringt, während das Komplement erhalten und nachweisbar bleibt.
5. Beide Serumreaktionen werden gehemmt durch Überschufs des Immunkörpers (Komplementablenkung), was aber leichter bei der Präzipitation, als bei der Bakteriolyse zu erzielen ist, wo es nur bei Anwendung von Immunserum mit Sicherheit gelingt.
6. Überschufs der Cholerasubstanz hindert ebenfalls das Zustandekommen der Reaktionen, was aber diesmal, umgekehrt wie im 5. Punkte, leichter bei der Bakteriolyse wie bei der Präzipitation zu demonstrieren ist. Dafür liefert die Bakteriolysehemmung den
7. Beweis für die prinzipielle Identität der präzipitierenden und bakteriolytischen Serumwirkung. Denn sie erfolgt in gleicher Weise durch Zusatz geformter Vibrionen (zu hoher Einsaat) wie gelöster Vibrionensubstanz, und es

läfst sich leicht zeigen, dafs im letzteren Falle der Verlust an bakterizider Wirkung mit einem Präzipitationsvorgange immer verbunden ist.

Diesen Tatsachen, welche zwingend für eine unitarische Auffassung der Serumaktivität sprechen, können nur wenige Argumente zugunsten der Existenz prinzipiell gesonderter präzipitierender und bakteriolytischer Serumwirkungen entgegengesetzt werden. Was zunächst die Annahme eigener Stoffe, der Präzipitine und Bakteriolysine betrifft, so ist eine solche Annahme eine durchaus erlaubte und gerechtfertigte Hypothese, solange man sich die neu aufgefundenen Serumeigenschaften und Serumwirkungen nicht anders deuten kann. Die Hypothese wird aber sofort erschüttert, sobald ein Weg gezeigt ist, dieselben auf eine einfachere, noch besser auf eine einheitliche Weise zu erklären. Nichts in der vorliegenden Untersuchung hat darauf hingewiesen, dafs für hypothetische Präzipitine und Bakteriolysine eine wirkliche, materielle Grundlage im Serum vorhanden sei. Dafür aber liefs sich zeigen, dafs die beiden mehr oder weniger selbständigen Gruppen, in welche man bei genauer Analyse die angenommenen Stoffe zerlegen mufste, tatsächlich im Serum vorhanden sind und ganz ähnlich wirken, wie es Ehrlichs genial entworfene und durchgeführte Konstruktion gefordert hatte. Die wirksame, dabei thermolabile Gruppe, das Komplement, ist ein wirkliches Ferment, das notwendig ist, um die bindende Gruppe, den ebenfalls reellen Immunkörper, mit der reaktionsfähigen Substanz der Bakterien zusammenzubringen. Die Verschiebung, welche der Standpunkt der Ehrlichschen Theorie erfährt, liegt nur darin, dafs der Immunkörper nicht nur die Reaktion einleitet und bedingt, sondern dafs er sie durchführt, allerdings nur mit Hilfe des Komplementes.

Für eine gewisse Sonderstellung der präzipitierenden und bakteriziden Serumwirkung scheint zunächst noch die etwas abweichende Inaktivierungstemperatur für beide zu sprechen. Für das normale Rinderserum ist aber diese Verschiedenheit bereits viel geringer und tritt meist weniger hervor als bei Immunserum und überdies trägt die leicht nachweisbare Relativität der In-

aktivierungstemperatur noch weiter zur Verwischung des Unterschiedes bei; ja sie gibt sogar einen guten Anhaltspunkt für eine weitere Beurteilung und Klarstellung der obwaltenden Verhältnisse ab. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dafs quantitative Verhältnisse des Immunkörpers und Komplementes eine Rolle im Ablauf der Serumreaktionen zu spielen scheinen. Da Hitze vorwiegend das Komplement schädigt, so mufs mit steigendem Temperaturgrade (bzw. längerer Dauer der Erwärmung) ein Serum immer ärmer an wirksamem Komplemente werden. Wenn man nun sieht, wie am frühesten die bakteriolytische, etwas später die präzipitierende, zuletzt die agglutinative Fähigkeit des Serums relativ und absolut abnimmt, so folgt der Schlufs, dafs bei gleichem Immunkörpergehalte zur Einleitung der Bakteriolyse sehr viel, zur Präzipitation weniger, zur Agglutination am wenigsten Komplement notwendig ist. Das steht in bester Übereinstimmung mit der absoluten Wirksamkeit des Serums, was ja bei Immunseren am deutlichsten hervortritt. Bekanntlich entfalten diese, wie am meisten v. Dungern für hämolytische Sera betont hat, so wie sie aus dem Tiere entnommen werden, überhaupt nicht jene lösende Fähigkeit, die ihnen nach ihrem Immunkörpergehalte zukommen würde; erst wenn man ein fremdes, sehr immunkörperarmes Serum als Komplement zusetzt, tritt sie hervor. Die präzipitierende Fähigkeit bedarf keines solchen Zusatzes und die agglutinierende verträgt die stärksten Verdünnungen, d. h. die stärkste relative Komplementverarmung.

In einem merkwürdigen und gewifs nicht bedeutungslosen Gegensatze dazu steht die Möglichkeit der Reaktivierung der drei Serumwirkungen, sobald einmal das Komplement zerstört ist: die Bakteriolyse und Hämolyse läfst sich spielend leicht, die Präzipitation und Agglutination so viel schwerer herstellen, dafs die diesbezüglichen Angaben sogar vielfachen Zweifeln begegnet sind.

Das scheint auf den ersten Anblick hin einen Widerspruch gegen die Behauptung zu bilden, dafs gerade zur Bakteriolyse sehr viel, zur Einleitung der anderen Serumreaktionen viel weniger Komplement nötig sein soll; denn es sieht so aus, als ob sich eine sehr geringe Komplementmenge leichter als eine grofse er-

gänzen lassen müsse. Aber die Lösung des Widerspruches liegt in der Aufdeckung des πρῶτον ψεῦδος der Reagenzglasversuche mit Serum: man setzt nie ein wirkliches Komplement zu, sondern aktives Serum, also eine Mischung von Immunkörper und Komplement. Ist ein solches, wie z. B. das als Komplementquelle viel benutzte Meerschweinchenserum, überhaupt sehr arm an Immunkörpern, so kommen sie bei einem bakteriolytischen oder hämolytischen Prozesse nicht zur Geltung, und man hat daher einiges Recht, wirklich blofs von Komplement zu reden. Dort aber, wo die Reaktion bei Gegenwart von viel Immunkörper durch relativ wenig Komplement eingeleitet wird, wie bei der Agglutination und Präzipitation stört der Eigengehalt des aktiven Serums an Immunkörpern so sehr, dafs es zur Ergänzung eines inaktivierten anderen Serums nicht zu brauchen ist. Aus diesem Grunde ist die Ergänzung eines inaktivierten agglutinierenden Immunserums Bail[1]) am besten mit der Exsudatflüssigkeit infizierter Tiere gelungen, wo die Immunkörper durch die Bakterienvermehrung verbraucht waren, während das Komplement in relativ reinem Zustande übrig blieb und deshalb konnte auch Herr Dr. Braun die Ergänzung der Agglutination eines durch Hitze inaktivierten Rinderserums mit einem anderen durchführen, das vorher mit Bakterien behandelt war. Damit hängt es offenbar auch zusammen, dafs die Hemmung der verschiedenen Serumreaktionen durch inaktiviertes Serum, also durch Immunkörperüberschufs verhältnismäfsig leicht bei der Agglutination, schwerer bei der Präzipitation, am schwersten bei der Bakteriolyse und zwar da nur durch den künstlich vermehrten Immunkörpergehalt spezifischer Sera zu erreichen ist.

Weitere Aufschlüsse gibt die Untersuchung des Einflusses, welchen die Menge der Bakteriensubstanz auf den Ablauf der Serumreaktionen ausübt. Berücksichtigt man nur das Geschehen an Vibrionen selbst, so sieht man, wie sowohl die Agglutination als die Bakteriolyse bei Anwendung einer zu grofsen Menge von Cholerakultur aufhört: der physiologische Effekt der Bakteriolyse

1) Dieses Archiv, Bd. 43.

im Plattenversuche wird überhaupt unmerklich, bei der Agglutination sieht man, dafs von einer gewissen Menge Vibrionen an nicht mehr so viel agglutiniert wird, als der Kraft des Serums nach zur Zusammenballung gebracht werden könnte, sondern viel weniger. Daraus folgt mit Sicherheit, dafs die Reaktion bei Anwesenheit von zuviel Bakteriensubstanz für eine beschränkte Menge Serums verhindert oder ganz unmöglich wird. Die Bakteriensubstanz ist nach der hier entwickelten Vorstellung der eine der reagierenden Stoffe, der andere ist der Serumimmunkörper. Wenn, wie eben bemerkt wurde, auch der Überschufs dieses die Reaktion als Komplementablenkung oder Agglutinoidwirkung erschwert oder unmöglich macht, so liegt eine sofort auffallende Analogie zu einem allgemein bekannten Verhalten der Fermente vor, wonach Überschufs des einen oder des anderen der durch ein Ferment zur Reaktion gebrachten Substanzen die Fermentwirkung verhindert, und es besteht somit aller Grund, das Ausbleiben der Reaktion bei Überschufs von Bakteriensubstanz oder Serumimmunkörper in einem Versagen des Komplements zu suchen, das sich auch hier wie andere, bekanntere Fermente verhält.

Dann aber kann man sich folgende Vorstellung von der Serumreaktion auf geformte Bakteriensubstanz machen. Eine bestimmte Menge aktiven Rinderserums enthält eine gewisse Menge Immunkörper und überdies ein Ferment, das Komplement. Setzt man eine mäfsige Menge von Vibrionen zu, so wird die einzig mögliche Reaktion, die Verbindung von Immunkörper und Bakteriensubstanz durch das vorhandene Komplement veranlafst und als Präzipitation innerhalb des Bakterienleibes bis zur vorläufigen Vollendung der Bakteriolyse durchgeführt. Steigert man die Menge der Vibrionen, so werden die Verhältnisse für die katalysatorische Wirkung des Komplementes durch Überschufs der einen reagierenden Substanz ungünstig, es kommt nicht mehr zur vollständigen Reaktion, sondern nur zu einer Art Vorstufe derselben, der Agglutination, bis schliefslich auch diese bei weiterer Vermehrung der zugesetzten Vibrionenzahl aufhört und nur noch ein Rudiment der katalysatorischen Komplement-

wirkung in der sog. Besetzung der Bazillen mit Immunkörper übrig bleibt, eine Art lockerer Paarung der reagierenden Substanzen, die keine äufserlich sichtbaren Folgen mehr hat, und die, wie die Versuche von Landsteiner, Eisenberg u. a. zeigen, unter Umständen leicht gelöst werden kann. — Der gleiche Effekt mufs aber auch eintreten, wenn bei gleichbleibender Vibrionenzahl das Komplement durch Erwärmung vermindert, besser ausgedrückt, wenn seine katalysatorische Wirkung durch höhere Temperatur geschädigt wird. Der Rest, der danach zurückbleibt, wird in der Entfaltung seiner Kraft jetzt durch den Überschufs der anderen reagierenden Substanz, des Immunkörpers gehemmt, es tritt bei der sog. Inaktivierung erst Komplementablenkung für die bakteriolytische, später für die agglutinatorische Serumreaktion (Agglutinoidbildung) ein, und nur ein ganz geringes, gegen Erhitzung sehr resistentes Komplementüberbleibsel erlaubt auch dann noch bis zu einem gewissen Grade die sogenannte Besetzung der Bakterien mit Immunkörper. Komplementablenkung für Bakteriolyse ist aber das gleiche, was Agglutinoidbildung für die Agglutination ist. Einen sehr deutlichen Beweis dafür bilden die Verhältnisse des spezifischen Immunserums, deren Untersuchung auf die Namen von Kraus, Eisenberg, Scheller, Bail u. a. zurückgeht. Ein konzentriertes Immunserum agglutiniert schon nach kurzer Zeit nicht mehr, erst in Verdünnung entfaltet es starke Wirkung. Es hat eben das Komplement durch die Lagerung gelitten und befindet sich im reinen Serum im Mifsverhältnisse gegen den Immunkörpez, dessen Überschufs jetzt hemmt. Eine Verdünnung betrifft zwar in gleicher Weise Komplement wie Immunkörper, aber das Mifsverhältnis beider ist doch beseitigt, weil ja ein Ferment an proportionale Mengenverhältnisse nicht absolut gebunden ist. Für Bakteriolyse, wo öfters schon ein frisch entnommenes spezifisches Serum Komplementablenkung aufweist, liegt diese Erklärungsart noch näher. Mit einem solchen kann man das Maximum der Wirkung nur erzielen, indem man den Immunkörper verdünnt; das kann aber nicht durch einfachen Zusatz von Kochsalzlösung geschehen, weil dieser das Komplement

unverhältnismäfsig stärker betreffen würde als den Immunkörper. Hingegen liefert Zusatz eines von Natur aus immunkörperarmen Serums, also einer relativ konzentrierten Komplementlösung, eine Verdünnung, welche den Immunkörperüberschufs beseitigt, ohne die bis zum Ende, d. h. der Bakteriolyse gehende Fermentwirkung in der dazu nötigen Konzentration zu beeinträchtigen. Statt dieser Methode kann man aber auch den Immunkörper selbst zu vermindern versuchen, und so erklärt sich der merkwürdige Ausfall einiger Versuche mit teilweise inaktiviertem Rinderserum.

I. Verwendet wird teilweise aktives, teilweise bei 48° und 52° durch je $^1/_2$ Std. erhitztes Rinderserum. Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur:

| | Serum aktiv | $^1/_2$ Std. 48° erwärmt | $^1/_2$ Std. 52° erwärmt |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm Na-Cl-Lös. | 0 | 632 | 8864 |
| 0,1 » » + 0,001 ccm Extrakt | 0 | 528 | 5960 |
| 0,1 » » + 0,005 » » | 736 | 1424 | 11 200 |
| 0,1 » » + 0,01 » » | 2128 | 1136 | 10 300 |
| 0,1 » » + 0,05 » » | üb. 10 000 | ca. 10 000 | ca. 40 000 |

II. Verwendet wird teils aktives, teils auf 48° und 50° erwärmtes Serum. Einsaat 0,01 ccm Bouillonkultur.

| | Serum aktiv | $^1/_2$ Std. 48° erwärmt | $^1/_2$ Std. 50° erwärmt |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 0 | 10 | 980 |
| 0,1 » » + 0,0005 ccm Extrakt | 0 | 0 | 4 |
| 0,1 » » + 0,001 » » | 4 | 0 | 324 |
| 0,1 » » + 0,005 » » | 0 | 2400 | ca. 3000 |
| 0,1 » » + 0,01 » » | 312 | ca. 5000 | üb. 10 000 |
| 0,1 » » + 0,05 » » | ca. 9000 | üb.10 000 | |

Für solche Versuche, die allerdings nicht immer gleichmäfsig verliefen, dürfte keine andere Erklärung möglich sein als die, dafs die Erhitzung nur einen Teil des Komplementes, der zur Bakteriolyse notwendig war, zerstörte, dadurch einen Immunkörperüberschufs und teilweise Komplementablenkung hervorrufend. Durch die unmerkliche Präzipitation der kleinsten zugesetzten Extraktmengen wurde ein Teil des Immunkörpers beseitigt und dadurch die Bedingung für die noch mögliche Bakteriolyse wieder hergestellt. Ein stärkerer Extraktzusatz zerstörte natürlich durch Immunkörperentfernung jede Wirkung.

Vermindert man bei gleichbleibender Vibrionenmenge den Immunkörper, wie dies durch Zusatz von Extrakt und Einleitung der danach auftretenden Präzipitation möglich ist, so hört natürlich, mangels eines der reagierenden Stoffe, jede Reaktion auf Bakterien auf und zwar, wie zu erwarten ist für Bakteriolyse früher als für Agglutination. Sie kann aber durch Zusatz von Immunserum und auch von erhitztem Rinderserum (namentlich für Hämolyse) wieder hergestellt werden, und dabei tritt nun jene eigentümliche Form der Komplementablenkung auf, welche auf Seite 378 ff. beschrieben wurde. Es ist sehr schwer, diese Erscheinung zu erklären, welche sich so definieren läfst, dafs nach Behandlung eines Rinderserums mit Choleraextrakt die verlorengegangene Bakteriolyse sich zwar ergänzen läfst, aber nur durch bestimmte Mengen von spezifischem Immunserum; werden diese überschritten, so tritt Vibrionenvermehrung auf und zwar weit, früher als das im unveränderten Serum durch Komplementablenkung geschieht.

Anscheinend ergibt diese Feststellung einen Widerspruch gegen die bisher angewendete Erklärungsweise der Serumreaktionen. Denn nach Entfernung des natürlichen Immunkörpers des Rinderserums durch Präzipitation dürfte die Hemmung durch einen Überschufs von frisch zugesetztem erst später erfolgen, als wenn der ursprüngliche noch vollständig erhalten ist. Man darf dabei aber eines Umstandes nicht vergessen, der schon vorher hervorgehoben wurde, nämlich dafs die Entfernung des Choleraextraktes durch Präzipitation niemals eine vollständige ist, und dafs um so mehr Extrakt unausgefällt erhalten bleibt, je mehr von vornherein zugesetzt wurde. Ein Blick auf die Versuchsresultate der Seiten 378, 379 zeigt, dafs auch die Komplementablenkung im ausgefällten Serum um so leichter und schneller erfolgt, je mehr Extrakt zur Ausfällung verwendet wurde. Man kann nun bei Durchführung eines derartigen bakteriolytischen Versuches leicht beobachten, wie sich die Proben, in denen bei Immunserumzusatz Wachstum eintritt, mehr weniger rasch und stark durch Präzipitation trüben. Danach liegt es sehr nahe, den Grund dieser Komplementablenkung in einer sekundären

Präzipitation, die sich an dem von der ersten Ausfällung her gelöst gebliebenen Extrakte abspielt, zu suchen. Denn auch ein Immunserum erleidet durch Extraktzusatz und Präzipitation Immunkörperverlust.

Die wenigen Versuche mit Immunserum, deren einige hier angeführt seien, hatten nur den Zweck, festzustellen, dafs der spezifische Immunkörper den gleichen Regeln folgt wie der natürliche des Rinderserums.

I. Es werden hergestellt:

| | Extrakt | | Immunserum | | NaCl-Lösung |
|---|---|---|---|---|---|
| I. | 0,5 ccm | + | 0,001 ccm | in | 0,1 ccm |
| II. | 0,5 » | + | 0,01 » | » | 0,1 » |
| III. | 0,5 » | + | 0,1 » | » | 0,1 » |

IV., V., VI. in gleicher Weise wie I.—III aber mit normalem Kaninchenserum hergestellt.

VII., VIII., IX. in gleicher Weise wie I.—III. hergestellt, aber statt mit Extrakt mit Na Cl-Lösung.

Das Immunserum stammt von einem mit bei 60° abgetöteten Vibrionen immunisierten Kaninchen und ist frisch. Bei 2std. Aufenthalt bei 37° entsteht in III. typische, in II. beginnende Ausflockung, I. zeigt nur Trübung. Die Proben werden zentrifugiert und ½ Std. auf 56° erhitzt.

Der Versuch zerfällt in 2 Teile:

a) Wirkt das Immunserum nach der Präzipitation noch bakteriolytisch? Als Versuchsserum dient normales Meerschweinchenserum. Einsaat 15—20 000 Vibrionen.

| | Meerschw.-Serum | Na Cl-Lösung | | Immunserum | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | + 0,75 ccm | | | 192 |
| 2. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 ccm von I | entspricht | ∞ |
| 3. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » VII | 0,0001 ccm | 1 |
| 4. | 0,25 » | + 0,57 » | + 0,18 » » I | entspricht | ∞ |
| 5. | 0,25 » | + 0,57 » | + 0,18 » » VII | 0,0003 ccm | 0 |
| 6. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » II | entspricht | ∞ |
| 7. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » VIII | 0,001 ccm | 0 |
| 8. | 0,25 » | + 0,57 » | + 0,18 » » II | entspricht | ca. 80 000 |
| 9. | 0,25 » | + 0,57 » | + 0,18 » » VIII | 0,003 ccm | 0 |
| 10. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » III | entspricht | 4 |
| 11. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » IX | 0,01 ccm | 0 |
| 12. | 0,25 » | + 0,57 » | + 0,18 » » III | entspricht | 0 |
| 13. | 0,25 » | + 0,57 » | + 0,18 » » IX | 0,03 ccm | 0 |

b) Hat das Extrakt seine hemmende Wirkung durch die Präzipitation verloren? Einsaat wie im Teile a). Als Versuchsserum dient das gleiche Meerschweinchenserum, das für 0,25 ccm 0,0001 ccm Immunserum enthält.

| | Meerschw.-Serum | Na Cl-Lösung | Extrakt | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | + 0,75 ccm | | | 0 |
| 2. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 ccm von I | entspricht | ∞ |
| 3. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » IV | 0,05 ccm | ∞ |
| 4. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,12 » » I | entspricht | ∞ |
| 5. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,12 » » IV | 0,1 ccm | ∞ |
| 6. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » II | entspricht | ∞ |
| 7. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » V | 0,05 ccm | ∞ |
| 8. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,12 » » II | entspricht | ca. 120 000 |
| 9. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,12 » » V | 0,1 ccm | ∞ |
| 10. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » III | entspricht | 0 |
| 11. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,06 » » VI | 0,05 ccm | ∞ |
| 12. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,12 » » III | entspricht | 0 |
| 13. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,12 » » VI | 0,1 ccm | ∞ |

II. Es werden hergestellt:

| | Immunserum | Extrakt |
|---|---|---|
| I. | 0,05 ccm | + 0,5 ccm |
| II. | 0,05 » | + 2,5 » |
| III. | 0,05 » | + 3,75 » |

Nach 1 Std. Aufenthalt ist die Präzipitation überall sehr stark, die Niederschläge z. T. bereits abgesetzt. Die Proben werden zentrifugiert und $^1/_2$ Std. auf 56° erwärmt und daraus die Verdünnungen des Versuches hergestellt.

Als Versuchsserum dient normales Kaninchenserum. Einsaat 10—16 000 Vibrionen.

a) Wirkt das Immunserum noch bakteriolytisch?

| | Kaninchenserum | Na Cl-Lösung | Immunserum | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 0,25 ccm | + 0,75 ccm | | | 3 680 |
| 2. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,0001 ccm aus | I | 7 928 |
| 3 | 0,25 » | + 0,7 » | + 0,0005 » » | I | 1 024 |
| 4. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,001 » » | I | 0 |
| 5. | 0,25 » | + 0,69 » | + 0,005 » » | I | 0 |
| 6. | 0,25 » | + 0,63 » | + 0,01 » » | I | 0 |
| 7. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,0001 » » | II | 720 |
| 8 | 0,25 » | + 0,7 » | + 0,0005» » » | II | 193 |
| 9. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,001 » » | II | 62 |
| 10. | 0,25 » | + 0,49 » | + 0,005 » » | II | über 15 000 |
| 11. | 0,25 » | + 0,23 » | + 0,01 » » | II | ca. 100 000 |
| 12. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,0001 » » | III | 328 |
| 13. | 0,25 » | + 0,7 » | + 0,0005 » » | III | 264 |
| 14. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,001 » » | III | 560 |
| 15. | 0,25 » | + 0,37 » | + 0,005 » » | III | ca. 100 000 |
| 16 | 0,25 » | + 0 » | + 0,01 » » | III | |
| 17. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,0001 » | unverändert | 0 |
| 18. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,001 » | » | |
| 19. | 0,25 » | + 0,65 » | + 0,01 » | » | |

b) Hat das Extrakt seine hemmende Wirkung durch die Präzipitation verloren? Als Versuchsserum dient Kaninchenserum, das für 0,25 ccm 0,0001 ccm Immunserum enthält.

| Kaninchenserum | NaCl-Lösung | Extrakt | |
|---|---|---|---|
| 1. 0,25 ccm | + 0,75 ccm | | 0 |
| 2. 0,25 » | + 0,7 » | + 0,05 ccm aus I | 0 |
| 3. 0,25 » | + 0,65 » | + 0,1 » » I | 0 |
| 4. 0,25 » | + 0,7 » | + 0,05 » » II | 16 |
| 5. 0,25 » | + 0,65 » | + 0,1 » » II | 320 |
| 6. 0,25 » | + 0,7 » | + 0,05 » » III | 272 |
| 7. 0,25 » | + 0,65 » | + 0,1 » » III | 944 |
| 8. 0,25 » | + 0,7 » | + 0,05 » unverändert | über 100 000 |
| 9. 0,25 » | + 0,65 » | + 0,1 » » | |

Der Versuch I ist an sich vollständig klar. Im Teil b) des II. Versuchsbeispiels tritt der Verlust der hemmenden Extraktwirkung unmittelbar hervor, der Teil a) zeigt den Verlust des Immunserums an bakteriolytischen Immunkörpern mit steigender Menge des zugesetzten Extraktes an, wozu sich überdies die hemmende Wirkung des von der Präzipitation her zurückgebliebenen Extraktes in den Serumproben II und III gesellt.

Das Immunserum verhält sich also mit seinem spezifischen Immunkörper der gelösten Cholerasubstanz gegenüber wie das normale Rinderserum.

Nur äufserlich abweichend vom Bilde, das die Bakteriolyse und die Agglutination darbietet, verhält sich die Präzipitation. Sie ist einfach das Gegenstück dessen, was an der geformten Vibrionensubstanz geschieht, sobald diese gelöst als Extrakt vorliegt. Wie die Bakteriolyse, so ist auch die Präzipitation nichts anderes als die durch Fermentwirkung herbeigeführte Verbindung von Bakteriensubstanz und Serumimmunkörper: das Wesen beider Reaktionen ist das gleiche und nur die Form des äufserlichen Geschehens ist verschieden. Das eben gebrauchte Schlagwort drückt das Resultat der ganzen Untersuchungsreihe treffend aus: Bakteriolyse ist nichts anderes als Präzipitation der Bakteriensubstanz in ihrer morphologisch determinierten Erscheinungsweise, und in diesem Sinne ist die Präzipitation die einzig mögliche Reaktion zwischen Serum und Bakterien.

Das mikroskopische Bild der Bakteriolyse bietet nichts dar, was dieser Anschauung widersprechen würde, das Aussehen einer vollständig „aufgelösten" Vibrionenmenge ist das gleiche wie das eines Präzipitates. Wieso die Verbindung des Serumimmunkörpers mit der Vibrionensubstanz, so lange diese noch geformt und dabei lebendig ist, möglich ist, das wird zu einem morphologischen Problem der Bakterienkunde, zu dessen Lösung Ansätze in den Arbeiten von Baumgarten, Walz und Fischer

vorliegen. Ob der Serumimmunkörper eine gesonderte Bakterienmembran durchdringen mufs, ehe er mit dem kolloidalen Inhalt des Vibrio Niederschläge bilden kann, welche die Hülle zerreifst, oder ob der gesamte Bazillenleib in die Präzipitation einbezogen wird, das sind Sonderfragen, deren Besprechung nicht mehr hierhergehört. Dafs aber die möglichst vollständige Verbindung von Bakteriensubstanz und Serum schliefslich den Tod des Mikroorganismus herbeiführen mufs, liegt auf der Hand.

Auch die weitere Frage kann aufgeworfen werden, welcher Stoff im Serum als Immunkörper fungiert. Eigene Versuche darüber fehlen, es sei aber namentlich auf die Arbeiten von Moll hingewiesen, die eine ganz innige Beziehung zwischen Globulingehalt und präzipitierender Kraft eines Serums feststellen konnten, sowie auf die im grofsen übereinstimmenden Resultate der Forschungen, welche die Aktivität des Serums an das Globulin und seine verschiedenen Fraktionen gebunden fanden. (Pick, Obermeyer, Ascoli u. v. a.)

Ein Einwand, der gegen die prinzipielle Gleichsetzung von Bakteriolyse und Präzipitation erhoben werden könnte, mufs noch berücksichtigt werden. Es gibt nämlich sehr viele normale Sera, bei denen man Bakteriolyse, aber nur sehr wenige, bei denen man Präzipitation feststellen kann, ein Mifsverhältnis, das erklärt werden mufs. Die Erklärung dafür liegt aber in dem wiederholt hervorgehobenen Umstande, dafs eine bestimmte Beziehung zwischen der präzipitierenden Kraft eines Serums und der Konzentration der gelösten präzipitablen Substanz einer Flüssigkeit besteht. Je stärker die letztere, umso geringer kann die erstere sein und umgekehrt. Die stärkste Konzentration von Bakteriensubstanz findet sich aber im Bazillenleibe selbst und an ihm kann daher die präzipitierende Kraft eines Serums als Bakteriolyse voll zur Geltung kommen.

Es wird auch die merkwürdige Erscheinung leicht verständlich, dafs Bakterien, namentlich Typhusbazillen, auf verschiedene Weise leicht eine mehr weniger vollständige Widerstandskraft gegen die Einwirkung des Serums erlangen können. Der Erklärungs-

möglichkeiten gibt es dabei gleich mehrere, die sich experimentell auf ihre Brauchbarkeit prüfen lassen werden. Wenn z. B. der Bazillus eine differenzierte Hülle hat, welche das Serum erst durchdringen mufs, ehe es mit der Bazillensubstanz reagieren kann, so braucht diese nur, z. B. durch Verschleimung undurchdringlich zu werden. Wäre aber der Bazillus nackt und etwa nur, wie die Amöben, von einer Art Ektoplasma umgeben, so kann auch dieses entweder impermeabel werden, oder der Bazillus kann sogar die äufsersten Teile seiner Leibessubstanz preisgeben; die Präzipitation, die in diesen stattfindet, kann dann selbst eine für weitere Serumwirkung undurchlässige Schichte liefern. Auf jede dieser Möglichkeiten kann dann die Bildung von Kapseln zurückgeführt werden, welche die gegen Serum widerstandsfähigen Bakterien öfters, wenn auch nicht immer auszeichnet. Treffen aber diese Erklärungsweisen nicht zu, so mufs schon eine ganz geringe Änderung des Chemismus der Bakteriensubstanz ausreichen, um die Serumimmunkörper fernzuhalten, da ja ohnedies schon die normalen nur eine sehr geringe Verwandtschaft zu denselben haben.

Vermag nun die durch die Reagenzglasversuche erlangte Vorstellungsweise der Serumaktivität, nach der diese einzig und allein eine unter verschiedenen äufseren Formen stattfindende Reaktion zwischen Serum und Bazillensubstanz unter dem katalysatorischen Einflusse eines Fermentes ist, einen Anhaltspunkt für die Bildung der spezifischen Serumaktivität nach Vorbehandlung eines Tieres mit Bazillensubstanz zu geben? Immunisierung darf man eine derartige Vorbehandlung nicht ohne weiteres nennen. Das was das Serum leisten kann, sind Vorgänge an der Bazillensubstanz, die stattfinden ohne Rücksicht darauf, ob der Bazillus Krankheit erzeugen kann oder nicht. Nur gegen Bazillensubstanz richten sich wieder die spezifischen Veränderungen des Blutes und Serums, welche nach Einspritzung von Bazillen und Extrakten aus solchen entstehen; ob das mit der Verhütung der Krankheit, die durch Bazillenvermehrung zustandekommt, also der wirklichen Immunität, zusammenhängt, das ist eine ganz andere Frage.

Die erste und ursprünglichste Anschauung über die Entstehung der »Antikörper«, zu denen ja auch die spezifischen Bakteriolysine gehören, war die namentlich von Buchner und Metschnikoff vertretene, dafs sie Abkömmlinge des injizierten Bakterienstoffes seien, verändert durch Einflüsse des Körpers. Gegen diese Auffassung, die namentlich die nicht unbegrenzte, aber unleugbare Spezifität aufs beste erklärte, wurde besonders seit Knorrs Untersuchungen am Tetanustoxin und Antitoxin das Mifsverhältnis betont, in welchem die Entstehung sehr grofser Mengen von Antikörpern mit der winzigen Menge eingespritzten Antigens stehe. Die Theorie Ehrlichs schrieb daher auch dem vorbehandelten Organismus die Erzeugung der Antikörper ausschliefslich zu und liefs dem eingespritzten Stoffe nicht viel mehr Bedeutung als die eines nur vorübergehend wirksamen Reizes; jedenfalls sind Antitoxine, Bakteriolysine, Agglutinine usf. nichts anderes als Abkömmlinge des Organismus, die nichts von dem Antigen in sich enthalten, das die Veranlassung ihrer Bildung war.

Es soll hier nur noch einiger im ersten Beginne stehender Versuche Erwähnung geschehen, die geeignet erscheinen, die Frage der Entstehung spezifischer Bakteriolysine in ein neues Licht zu stellen. Denn der Haupteinwand gegen die Buchner-Metschnikoffsche Anschauung von der Rolle, welche die eingespritzten Antigene bei der Antikörperentstehung spielen, das Mifsverhältnis zwischen den Mengen beider, erscheint sehr wesentlich abgeschwächt, wenn es gelingt zu zeigen, dafs der injizierte Stoff nicht mit einem Schlage aus dem Körper verschwindet, sondern dafs er, obwohl er Veränderungen erleidet, doch eine Zeitlang noch im Organismus fortwirkt. Wenn die in ein Tier eingeführte Bazillensubstanz einer bestimmten Serumreaktion unterliegt und durch sie verändert wird, das entstandene Reaktionsprodukt aber noch nicht inoffensiv geworden ist, sondern weitere Veränderungen durch das Serum erleidet, und wenn sich dieser Prozefs vielleicht noch fortsetzt, dann hat es gar nichts Wunderbares an sich, wenn minimale Bakterienmengen, wie z. B. in Friedbergers Versuchen, zu einer ganz unverhältnismäfsig erscheinenden Anhäufung von Antikörpern führen.

Die nachstehend mitgeteilten Versuche, welche diesen Gedankengang anregten, sind natürlich noch lange nicht als Beweise anzusehen, scheinen aber geeignet, die Untersuchung des vielbehandelten Problems der Serumaktivität auf ein neues Thema hinzuweisen. Ihr Hauptergebnis besteht, in kurzen Worten ausgedrückt, darin, dafs die fertige Verbindung von Bazillensubstanz und Serumimmunkörper, die je nachdem entweder als Präzipitat oder als Vibrionenrückstand nach Bakteriolyse vorliegt, noch nicht das definitive Endprodukt der Serumwirkung ist, sondern noch weiteren Veränderungen unterliegt, die das Serum ganz ähnlich beeinflussen wie der Vibrionenextrakt oder die Vibrionen selbst.

Setzt man die Aufschwemmung eines gewaschenen Präzipitates, das durch Fällung von Choleraextrakt mit Rinderserum entstanden ist, frischem aktiven Rinderserum zu, so vermag dieselbe erst in sehr grofsen Mengen eine Herabminderung der Serumbakteriolyse zu erreichen. Dennoch ist das Serum tiefgehend beeinflufst: denn ein Zusatz von Immunserum ruft in sehr ausgesprochener Weise das Phänomen der Komplementablenkung hervor. Ein ähnliches Resultat erhält man, wenn man ein Serum mit Präzipitat behandelt und dieses nach einiger Zeit durch Zentrifugieren wieder entfernt.

I. 20 ccm Choleraextrakt werden mit der 3fachen Menge aktiven Rinderserums gefällt, der mächtige Niederschlag wird gewaschen und in 10 ccm Na Cl-Lös. aufgeschwemmt. Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur. Verwendet wird teilweise reines, teilweise mit Immunserum versetztes Rinderserum.

| | nur Serum | Serum + 0,001 ccm Immunserum | Serum + 0,01 ccm Immunserum | Serum + 0,1 ccm Immunserum |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lös. | 0 | 0 | 0 | 304 |
| 0,1 » » + 0,4 » » + 0,2 ccm Präzipitataufschwemmung | 218 | 0 | 4 | ca. 35000 |
| 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm Na Cl-Lös. + 0,5 ccm Präzipitataufschwemmung | 1032 | 976 | 4640 | ∞ |

Die gleiche Präzipitataufschwemmung wird unter analogen Bedingungen zu Kaninchenserum zugesetzt. Einsaat ca. 10000 Keime.

| | nur Serum | Serum + 0,001 ccm Immunserum | Serum + 0,01 ccm Immunserum | Serum + 0,1 ccm Immunserum |
|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum + 0,6 ccm Na Cl-Lös. | 3 | 0 | 6300 | ca. 10000 |
| 0,2 » » + 0,4 » » + 0,2 ccm Präzipitataufschwemmung | 19400 | ∞ | ∞ | ∞ |
| 0,2 ccm Serum + 0,1 ccm Na Cl-Lös. + 0,5 ccm Präzipitataufschwemmung | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ |

II. Das gleiche Rinder- und Kaninchenserum wie im Versuchsbeispiele I. Von der daselbst benutzten Präzipitataufschwemmung werden je 2,25 ccm zentrifugiert und die Sätze mit 0,45 ccm aktivem Rinderserum, bzw. 0,9 ccm Kaninchenserum 1 Std. bei 37° stehen gelassen. Nach sorgfältigem Zentrifugieren wird das abgegossene klare Serum verwendet. Einsaat ca. 10000.

| | |
|---|---|
| 1. 0,1 ccm des behandelten Rinderserums + 0,6 ccm Na Cl-Lös. | 1528 |
| 2. 0,1 » » » » + 0,5 » » + 0,001 ccm Immunserum | 0 |
| 3 0,1 ccm des behandelten Rinderserums + 0,5 » » + 0,01 ccm Immunserum | ∞ |
| 4. 0,1 ccm des behandelten Rinderserums + 0,5 » » + 0,1 ccm Immunserum | ∞ |
| 5. 0,2 ccm des behandelten Kaninchenserums + 0,6 » » | 320 |
| 6. 0,2 » » » » + 0,5 » » + 0,001 ccm Immunserum | ca. 80000 |
| 7. 0,2 ccm des behandelten Kaninchenserums + 0,5 » » + 0,01 ccm Immunserum | ∞ |
| 8. 0,2 ccm des behandelten Kaninchenserums + 0,5 » » + 0,1 ccm Immunserum | ∞ |

III. 20 ccm Extrakt werden mit der doppelten Menge Rinderserums gefällt. Das gewaschene Präzipitat wird in 20 ccm Na Cl-Lös. aufgeschwemmt, zu 5 und 15 ccm neuerlich zentrifugiert und die so erhaltenen beiden Sätze a und b mit je 1,5 ccm aktiven Rinderserums $^1/_2$ Std. bei 37° gehalten. Dann wird neuerlich zentrifugiert. Einsaat $^1/_{2000}$ Agarkultur.

| | aktives Serum + 0,12 ccm | Zentrifugat a + 0,12 ccm | Zentrifugat b + 0,12 ccm |
|---|---|---|---|
| 0,9 ccm Na Cl-Lös. | 0 | 592 | 216 |
| 0,8 » » + 0,01 ccm Immunserum | 0 | 19000 | ∞ |
| 0,85 ccm Na Cl-Lös. + 0,05 » Immunserum | 0 | ca. 200000 | ∞ |
| 0,8 » » + 0,1 » Immunserum | 84 | ∞ | ∞ |

IV. Eine Kultur Cholera wird in 12 ccm aktiven Rinderserums aufgeschwemmt und über Nacht bei Zimmertemperatur belassen; der agglutinierte Satz, der keine kenntliche Vibrionen mehr enthält, wird gewaschen, in zwei

Teile geteilt, neuerlich zentrifugiert und mit je 1 ccm Rinder- und Kaninchenserum 1 Std. bei 37° gehalten, wobei er neuerlich flockig ausfällt. Die durch Zentrifugieren geklärte Flüssigkeit wird bei einer Einsaat von 16000 Vibrionen verwendet.

| | + 0,1 ccm behandeltes Rinderserum | + 0,1 ccm behandeltes Kaninchenserum |
|---|---|---|
| 0,6 ccm Na Cl-Lös. | 0 | ∞ |
| 0,5 » » + 0,001 ccm Immunserum | 0 | ∞ |
| 0,5 ccm Na Cl-Lös. + 0,01 » Immunserum | ca. 70000 | ∞ |
| 0,5 ccm Na Cl-Lös. + 0,1 ccm Immunserum | ∞ | ∞ |

Reines Rinderserum tötete vollständig ab, ebenso mit Zusatz von Immunserum, erst 0,1 ccm Immunserum lieferte ca. 400 Kalorien. Reines Kaninchenserum tötete bis auf wenige Keime, ergab Sterilität bei 0,001 ccm Immunserum, 2000 Keime bei 0,01, ca. 10000 bei 0,1 ccm Immunserumzusatz.

V. 8 ccm Extrakt werden mit 24 ccm frischen Rinderserums gefällt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Ferner wird eine reichliche Agarkultur in 12 ccm Serum aufgeschwemmt und ebenfalls über Nacht in Zimmertemperatur gehalten. Am anderen Morgen wird das Präzipitat und die sehr voluminöse, völlig agglutinierte, kaum noch kenntliche Vibrionen enthaltende Kulturmasse gewaschen, in je vier Teile geteilt, neuerlich zentrifugiert und die Sätze in folgender Weise weiter behandelt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. Präzipitat + 1 ccm akt. Rinderser. | + 0,1 ccm Na Cl-Lös. | a | ebenso mit d. Kulturmassen behandelten Rinderserum |
| II. » + 1 » » » | + 0,0001 ccm Immunserum | b | |
| III. » + 1 » » » | + 0,001 » » | c | |
| IV. » + 1 » » » | + 0,01 » » | d | |

als Kontrolle V 1 ccm Rinderserum + 0,1 Na Cl-Lös. ohne Zusatz.

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | + 0,1 ccm Serum I | + 0,1 ccm II | + 0,1 ccm III |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na-Cl-Lös. | 208 | 0 | 0 |
| 0,0005 ccm Immunserum + | 0 | 0 | 0 |
| 0,001 » » | 0 | 0 | 0 |
| 0,005 » » | 1136 | 392 | 312 |
| 0,01 » » | 2592 | 2000 | 2456 |
| 0,05 » » | 8600 | 7248 | 6352 |

| | + 0,1 ccm Serum IV | + 0,1 ccm V |
|---|---|---|
| 0,1 ccm Na-Cl-Lös. | 0 | 2 |
| 0,0005 ccm Immunserum | 0 | 0 |
| 0,001 » » | 0 | 0 |
| 0,005 » » | 1928 | 0 |
| 0,01 » » | 3680 | 0 |
| 0,05 » » | 9800 | 0 |

| | + 0,1 ccm Serum a | + 0,1 ccm b | + 0,1 ccm c | + 0,1 ccm d |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm NaCl-Lös. | 0 | 0 | 171 | 0 |
| 0,0005 ccm Immunserum | 0 | 0 | 39 | 0 |
| 0,001 » » | 89 | 0 | 0 | 0 |
| 0,005 » » | 218 | 3 | 75 | ∞ |
| 0,01 » » | 6240 | 5760 | 3448 | ∞ |
| 0,05 » » | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ |

VI. Das gewaschene Präzipitat aus 8 ccm Extrakt mit der dreifachen Menge aktiven Rinderserums wird in 4 Teile zentrifugiert und daraus hergestellt:

Serum I: Präzipitat + 1 ccm aktiven Rinderserums + 0,1 ccm Na Cl-Lös.
» II: Präzipitat + 1 ccm aktiven Rinderserums + 0,001 ccm Immunserum
» III: Präzipitat + 1 ccm aktiven Rinderserums + 0,01 ccm Immunserum
» IV: Präzipitat + 1 ccm aktiven Rinderserums + 0,05 ccm Immunserums

} $\frac{1}{2}$ Std. 37°, dann zentrifugiert

Ganz ebenso, aber ohne Präzipitat werden die Kontrollsera a, b, c, d hergestellt und behandelt.

| | + 0,11 ccm Serum I | + 0,11 ccm II | + 0,11 ccm III | + 0,11 ccm IV |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 2 | 0 | 0 | 112 |
| 0,001 ccm Immunserum | 0 | 0 | 27 | ca. 22 000 |
| 0,005 » » | 1552 | 120 | 11 000 | ∞ |
| 0,01 » » | 9700 | 992 | ca. 30 000 | ∞ |
| 0,05 » » | üb. 10 000 | 1440 | ca. 90 000 | ∞ |

Die Kontrollseren a bis d töteten überall vollständig oder bis auf vereinzelte Keime ab; nur die Proben mit je 0,05 ccm Immunserum lieferten in den Kolonienzahlen 408, 102, 320 und 336 die erste Spur von Komplementablenkung.

VII. Analog dem VI. Versuchsbeispiele mit aktivem Kaninchenserum angestellter Versuch mit dem in fünf gleiche Teile geteilten, gewaschenen Präzipitat von 8 ccm Extrakt mit 16 ccm Rinderserum.

Serum I: Präzipitat + 1,5 ccm Kaninchenserum + 0,15 ccm Na-Cl-Lös. — Serum a
» II: Präzipitat + 1,5 ccm Kaninchenserum + 0,00015 ccm Immunserum — » b
» III: Präzipitat + 1,5 ccm Kaninchenserum + 0,0015 ccm Immunserum — » c
» IV: Präzipitat + 1,5 ccm Kaninchenserum + 0,015 ccm Immunserum — » d
» V: Präzipitat + 1,5 ccm Kaninchenserum + 0,075 ccm Immunserum — » e

} Wie die Sera I bis V aber ohne Präzipitat hergestellt.

Nach 1 stdg. Aufenthalt bei 37° werden die Proben zentrifugiert und verwendet. Einsaat 18 000 Keime.

| | + 0,3 ccm Serum I | + 0,3 ccm II | + 0,3 ccm III |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 6624 | 49 | 0 |
| 0,0005 ccm Immunserum | 61 | 392 | 0 |
| 0,001 » » | 0 | 0 | 0 |
| 0,01 » » | 5424 | 3008 | 7604 |

| | + 0,3 ccm Serum IV | + 0,3 ccm V |
|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl.Lös | 0 | 160 |
| 0,0005 ccm Immunserum | 11 | 1216 |
| 0,001 » » | 60 | 2880 |
| 0,01 » » | ca. 13000 | ∞ |

| | + 0,3 ccm Serum a | + 0,3 ccm b | + 0,3 ccm c |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 3 | 288 | 0 |
| 0,0005 ccm Immunserum | 1 | 2 | 0 |
| 0,001 » » | 3 | 0 | 0 |
| 0,01 » » | 384 | 10 | 8 |

| | + 0,3 ccm Serum d | + 0,3 ccm e |
|---|---|---|
| 0,1 ccm Na Cl-Lös. | 0 | 128 |
| 0,0005 ccm Immunserum | 0 | 256 |
| 0,001 » » | 0 | 67 |
| 0,01 » » | 32 | 1376 |

Eine vollständige Deutung dieser Versuche zu geben, für welche bisher, soweit zu ersehen, keine anderen Beispiele in der Literatur vorliegen, kann noch kaum unternommen werden. Das hervorstechendste Merkmal derselben ist ein der Komplementablenkung analoges Versagen der Immunserumwirkung. Es liegt nach den S. 380 gegebenen Darlegungen am nächsten, eine Komplementabsorption durch das Präzipitat als Ursache anzunehmen, wodurch ein Mifsverhältnis zwischen dem rückbleibenden Reste desselben und dem Immunkörper eintreten würde. Aber aus den Beispielen V, VI und VII geht sehr deutlich hervor, dafs auch der Immunkörpergehalt des Serums, das mit Präzipitat behandelt ist, einen sehr wesentlichen Einflufs auf das spätere Geschehen hat. Es sieht ganz so aus, als ob jene Sera, welche am reichsten an Immunkörpern sind, durch die Präzipitatbehandlung am allermeisten verändert würden, was bei blofser Komplementabsorption ohne Beteiligung des Immunkörpers ganz unverständlich wäre. Eine genauere Analyse des Beispiels VI ergäbe, dafs im Serum IV, das bei Zusatz von 0,05 ccm Immunserum auf 1 ccm mit Präzipitat behandelt wurde, die absolute Bakteriolyse nur wenig gelitten hat, dafs

aber schon der geringste Zusatz von neuem Immunserum jede bakteriolytische Wirkung beseitigt, wovon das genau gleich hergestellte, ohne Präzipitat gelassene Kontrollserum d nichts aufweist. Das Serum II, dessen Immunkörpergehalt vor der Präzipitatbehandlung geringer war, ist weniger stark beeinflufst, zeigt sogar eine Besserung der Bakteriolyse gegen das ohne Immunserum der Präzipitatwirkung ausgesetzte Serum I. Noch viel deutlicher ist das alles beim Versuche VII mit Kaninchenserum. Hier kann die Bakteriolyse des Serums I, die durch die Präzipitatbehandlung verloren war, durch Zusatz geringer Immunserummengen wieder hergestellt werden, ganz so, als ob der Immunkörper durch Extrakt oder Bakterien vermindert worden wäre. Ein Zusatz von wenig Immunserum vor der Präzipitatbehandlung (Serum II und III) schützt vor diesem Bakteriolyseverlust und erst grofse Mengen Immunserum und Präzipitat rufen tiefgreifende Änderungen im Verhalten des Serums hervor. Man vergleiche mit dem Versuch VII folgenden Versuch mit Rinderserum.

**Es werden hergestellt:**

| | aktives Rinderserum | Extrakt | Immunserum (in 0,05 ccm NaCl-Lösung) | |
|---|---|---|---|---|
| Serum I | 1 ccm | + 0,2 ccm | + 0,0005 ccm | Die Präzipitate werden abzentrifugiert. |
| » II | 1 » | + 0,2 » | + 0,0025 » | |
| » III | 1 » | + 0,2 » | + 0,005 » | |
| | | | NaCl-Lösung | |
| » IV | 1 » | + 0,2 » | + 0,05 ccm | |

**Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.**

| | |
|---|---|
| 1. 0,25 ccm von Serum I . . . . . . . . . . . . | 10 300 |
| 2. 0,25 » » » II . . . . . . . . . . . . | 192 |
| 3. 0,25 » » » III . . . . . . . . . . . . | 0 |
| 4. 0,25 » » » IV . . . . . . . . . . . . | 9600 |
| 5. 0,25 » » » » + 0,0001 ccm Immunserum | 420 |
| 6. 0,25 » » » » + 0,0005 » » | 0 |
| 7. 0,25 » » » » + 0,001 » » | 0 |

Auch hier hat der vor der Präzipitation erhöhte Immunkörpergehalt des Rinderserums einen Schutz vor Bakteriolyseverlust erzielt, sowie der nachträgliche Immunserumzusatz diesen Verlust wieder ausgleichen konnte. Die Analogie mit dem Versuchsbeispiele VII und teilweise auch VI ist so unmittelbar ein-

leuchtend, dafs man wohl einiges Recht hat, anzunehmen, es müsse auch das anscheinende Endprodukt der Reaktion zwischen Serum und Cholerasubstanz noch ähnlich weiterwirken können, wie die Cholerasubstanz selbst. Die Art dieser Wirkung näher zu studieren, bleibt noch Aufgabe der Zukunft, welche es erhoffen läfst, dafs über die noch durchaus dunklen Vorgänge der spezifischen Immunkörperbildung einiges Licht verbreitet würde.

Jedenfalls läfst sich leicht zeigen, dafs die Wirkung des Präzipitates keine unerschöpfliche ist. Ein Präzipitat, das mit aktivem Serum behandelt wird, verliert dadurch schliefslich die Fähigkeit auf ein anderes Serum, sei es im Sinne einer Bakteriolysehemmung, sei es in dem einer Komplementablenkung, einzuwirken.

I. Der Teil a) des Versuches gibt Aufschlufs über die Wirkung gröfserer Präzipitatmengen auf reines und mit Immunserum versetztes Rinderserum, der Teil b) zeigt das Erlöschen der Präzipitatwirkung an. Einsaat überall $^1/_{3000}$ Kultur Cholera.

a) Das Präzipitat von 25 ccm Choleraextrakt mit der doppelten Menge aktiven Rinderserums wird in 2,5 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und diese Aufschwemmung dem Versuchsserum (aktiven Rinderserum) unmittelbar vor der Vibrioneneinsaat zugesetzt.

| | Präzipitat-aufschwemmung | reines Serum | Serum mit 0,0002 ccm Immunserum | Serum mit 0,002 ccm Immunserum | Serum mit 0,02 ccm Immunserum |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,2 » » | + 0,01 ccm | 4224 | 632 | 81 | 206 |
| 0,2 » » | + 0,05 » | 11 400 | 4864 | 2024 | 12 900 |
| 0,2 » » | + 0,1 » | 22 000 | 20 700 | 25 000 | ca. 40 000 |

b) Je 0,25 ccm der Präzipitataufschwemmung werden zentrifugiert, die Sätze mit a) 1,25, b) 2,5, c) 6,25 ccm aktivem Rinderserum $^1/_2$ Std. bei 37° behandelt, dann zentrifugiert, gewaschen und schliefslich als Präzipitate a, b, c in je 0,25 ccm NaCl-Lösung verteilt. Das gleiche Serum wie im Teile a dieses Versuches, der die Kontrolle abgibt.

| | Präzipitat | Präzipitat a | Präzipitat b | Präzipitat c |
|---|---|---|---|---|
| 0,2 ccm Serum | + 0,01 ccm | 1280 | 17 | 60 |
| 0,2 » » | + 0,05 » | 9000 | 992 | 416 |
| 0,2 » » | + 0,1 » | 17 500 | 13 400 | 720 |

II. Es werden hergestellt:

| | Rinderserum | |
|---|---|---|
| I 4 ccm Extrakt | + 8 ccm | Über Nacht bei Zimmertemperatur gehalten. In I hat sich typische Präzipitation, in II Agglutination und Bakteriolyse ausgebildet. |
| II 1 Agarkultur Cholera | + 8 » | |

Die Sätze beider Proben werden gewaschen und als I und II mit je 1,5 ccm aktivem Rinderserum 1 Std. lang bei 37° behandelt, dann zentrifugiert. Als Kontrolle dient III, ein aktives Serum. Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

a) Bakteriolyseverlust und Komplementablenkung.

| | Serum I | II | III |
|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm NaCl-Lösung | 1136 | 12 300 | 0 |
| 0,1 » » + 0,001 » Immunserum | 0 | 11 800 | 0 |
| 0,1 » » + 0,005 » » | ca. 18 000 | ca. 400 000 | 0 |
| 0,1 » » + 0,01 » » | ∞ | ∞ | 8 |
| 0,1 » » + 0,05 » » | ∞ | ∞ | 648 |

b) Erschöpfung der Präzipitate. Die aus dem Serum I und II des Versuchteiles a abzentrifugierten Präzipitate werden neuerlich mit je 0,5 ccm aktivem Rinderserum 1 Std. bei 37° behandelt, abzentrifugiert und in je 1 ccm frischen Rinderserums aufgeschwemmt. Nach 1 stdg. Aufenthalt bei 37° wird der Satz durch Zentrifugieren entfernt und die rückgebliebene Bakteriolyse dieser Sera IV und V untersucht.

| | Serum IV | V |
|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm NaCl-Lösung | 0 | 544 |
| 0,1 » » + 0,001 » Immunserum | 0 | 73 |
| 0,1 » » + 0,005 » » | 568 | 8000 |
| 0,1 » » + 0,01 » » | 2096 | ca. 25 000 |
| 0,1 » » + 0,05 » » | 2960 | » 80 000 |

Ganz übereinstimmend zeigen solche Versuche, daſs die eigenartige Wirkung des Präzipitates bzw. der Vibrionenrückstände nach Bakteriolyse durch Behandlung mit aktivem Serum verloren geht, daſs dazu aber sehr bedeutende Mengen notwendig sind, woraus man den Rückschluſs machen kann, daſs schon relativ kleine Präzipitatmengen sehr groſse Serummengen noch beeinflussen können. Tritt ähnliches auch im Tierkörper ein, so ist die Entstehung von viel Antikörpern nach Einspritzung von wenig Antigen verständlicher geworden.

Was sich für Veränderungen am Präzipitate abspielen, ist nur nach genauerer Untersuchung als sie bisher durchgeführt werden konnte, zu sagen. Ein feinverteiltes Präzipitat flockt im Rinderserum sofort wieder in groben voluminösen Stücken aus, viel schneller als dies etwa in Kochsalzlösung geschieht. Auflösungserscheinungen sind nicht auffällig.

Die merkwürdige Komplementablenkung der mit Präzipitat behandelten Sera ist, nachdem vieles gegen eine einfache Komplementabsorption spricht, sehr schwer zu erklären. Die Deutung, die der analogen Erscheinung nach Extraktfällung gegeben werden konnte (S. 409), trifft hier nicht zu. Aber die Komplementablenkung ist überhaupt ein noch kaum richtig gedeutetes Phänomen. Der Satz, dafs sie eintritt, wenn zwischen Immunkörper und Komplement ein Mifsverhältnis mit Überschufs des ersteren besteht, umschreibt nur den am leichtesten zu beobachtenden Fall. Er trifft schon nicht für eine andere Beobachtung zu, dafs nämlich in der Regel die Komplementablenkung leichter bei immunkörperarmen als bei immunkörperreichen normalen Seren eintritt, so z. B. im Meerschweinchenserum früher als im Rinderserum.

I. Verwendet wird frisches, gleichaltriges Meerschweinchen, Kaninchen und Rinderserum. Einsaat 0,02 ccm Cholerabouillonkultur.

| | | | Na Cl-Lösung | | Meerschweinchenserum | Kaninchenserum | Rinderserum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 | ccm | Serum | + 0,1 | ccm | 6456 | 103 | 0 |
| | | | Immunserum | | | | |
| 0,2 | » | » | + 0,0001 | ccm | 0 | 0 | 0 |
| 0,2 | » | » | + 0,0005 | » | 0 | 0 | 0 |
| 0,2 | » | » | + 0,001 | » | 0 | 0 | 0 |
| 0,2 | » | » | + 0,005 | » | 70 | 0 | 0 |
| 0,2 | » | » | + 0,01 | » | 376 | 60 | 0 |
| 0,2 | » | » | + 0,05 | » | über 10 000 | 560 | 0 |

II. Meerschweinchen und Rinderserum. Einsaat 0,03 ccm Bouillonkultur.

| | | | | | | Meerschweinchenserum | Rinderserum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | ccm | Serum | + 0,1 | ccm | Na Cl-Lösung | ca. 10 000 | 0 |
| 0,1 | » | » | + 0,001 | » | Immunserum | 400 | 0 |
| 0,1 | » | » | + 0,005 | » | » | 0 | 0 |
| 0,1 | » | » | + 0,01 | » | „ | 49 | 0 |
| 0,1 | » | » | + 0,05 | » | » | ca. 8000 | 72 |
| 0,1 | » | » | + 0,1 | » | » | $\infty$ | 1936 |

Damit stimmt die übrigens schon aus früheren Versuchen hervorgehende Erfahrung überein, dafs Eingriffe, welche erfahrungsgemäfs einen Immunkörperverlust bedingen, die Komplementablenkung erleichtern. Dazu gehört die Behandlung von Rinderserum mit relativ geringfügigen Mengen von Choleravibrionen.

III. Es werden hergestellt:

| | akt. Rinderserum | Cholera-Agarkultur |
|---|---|---|
| Serum I | 1 ccm | + 1/50 |
| » II | 1 » | + 1/25 |
| » III | 1 » | + 1/10 |
| » IV | 1 » | + 0 |

Die ganz ohne Zusatz fremder Flüssigkeit hergestellt. Proben bleib. 1 Std. bei 37°, wobei stärkste Agglutinat. mit Bildg. sehr voluminös. Haufen eintritt. Zentrifug.

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | Serum I | Serum II | Serum III | Serum IV |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm Na Cl-Lösung | 10 | 492 | 648 | 0 |
| 0,1 » + 0,001 » Immunserum | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,1 » + 0,005 » » | 32 | 336 | 272 | 0 |
| 0,1 » + 0,01 » » | 576 | 108 | 4320 | 8 |
| 0,1 » + 0,05 » » | 4280 | 5064 | üb. 10000 | 248 |

Vergleiche dazu auch das sehr beweisende Versuchsbeispiel IV auf S. 417.

Solchen Versuchen gegenüber versagt jede Erklärung der Komplementablenkung; auch eine solche durch nachträgliche Präzipitation ist nicht möglich, da die Bakteriolyse von Vibrionen im Rinderserum keine fällbare, gelöste Cholerasubstanz ergibt. Es bleibt vorläufig nichts anderes übrig als die Umschreibung der Versuchstatsache, dafs die Armut eines Serums an natürlichen Immunkörpern die Komplementablenkung ermöglicht oder erleichtert. Das ganze Phänomen, das aber wahrscheinlich sehr bedeutungsvoll ist, mufs erst von neuen Gesichtspunkten aus zusammenfassend studiert werden.

## Nachsatz.

Neuere Versuche sind geeignet, auf das Wesen der sog. Bindung von Immunkörpern an Bakterien oder Besetzung von solchen mit Immunkörpern einiges Licht zu werfen. S. 407 wurde gesagt, dafs diese Besetzung eine Art lockerer Paarung zwischen Bazillen und Serumsubstanz bei Anwesenheit sehr geringer Mengen katalysatorisch wirkenden Komplementes sein müsse. Die anscheinend unverändert lebensfähigen Vibrionen müssen aber doch durch diesen Vorgang sehr tief beeinflufst worden sein, denn sie ergeben nach einer Behandlung, die sonst wirksame Extrakte liefert, keine solchen Je mehr Immunserum zur »Besetzung« der Vibrionen verwendet wurde, um so schlechter werden die Extrakte, die an fällbarer Substanz immer mehr verarmen, wie Präzipitationsversuche mit normalem Rinderserum zeigen.

I. Je 1 Agarkultur Cholera wird versetzt

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. mit | 1 ccm Na Cl-Lösung | | |
| 2. » | 0,95 » | + 0,0005 ccm | Immunserum |
| 3. » | 0,95 » | + 0,005 | » |
| 4. » | 0,95 » | + 0,05 | » |

Nach 3 stdg. Stehen bei Zimmertemperatur wurden die Proben zentrifugiert, die Sätze gewaschen und mit je 1 ccm destilliertem Wasser 2 Std. bei 42—44° gehalten. Dabei trat undeutliche Reagglutination in 2, etwas stärkere in 3, vollständige in 4 ein. Die durch Zentrifugieren geklärten Flüssigkeiten wurden auf ihren Hemmungswert gegen Bakteriolyse normalen Rinderserums (Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur) geprüft.

| | Extrakt 1 | Extrakt 2 | Extrakt 3 | Extrakt 4 |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Rinderserum + 0,01 ccm Extrakt | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,1 » + 0,005 » | 2324 | 34 | 0 | 0 |
| 0,1 » + 0,1 » | 10360 | 7400 | 6800 | 0 |

0,1 ccm Rinderserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung tötete vollständig ab.

II. Es werden angelegt:

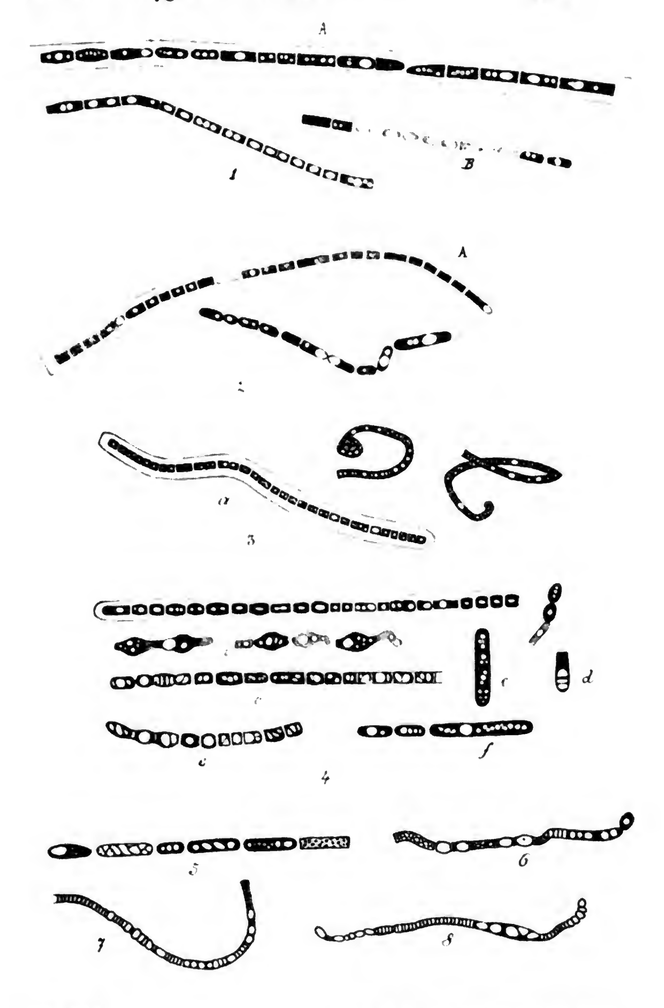
| | Immunserum | |
|---|---|---|
| 1. 1 Agarkult. in 1 ccm verdünnt. Bouill. | | 3 Std. Zimmertemp. Dabei erfolgt in 2 sehr unvollständ., i. 3 sehr langsame, in 4 u. 5 rasche u. vollständ. Agglutin. |
| 2. 1 » » 0,9 » | + 0,001 ccm | |
| 3. 1 » » 0,9 » | + 0,01 » | |
| 4. 1 » » 0,9 » | + 0,05 » | |
| 5. 1 » » 0,9 » | + 0,1 » | |

Die Sätze aller Proben werden dreimal mit verdünnter Bouillon gewaschen und mit je 1 ccm destillierten Wassers 3 Std. bei 42—45° extrahiert und zentrifugiert.

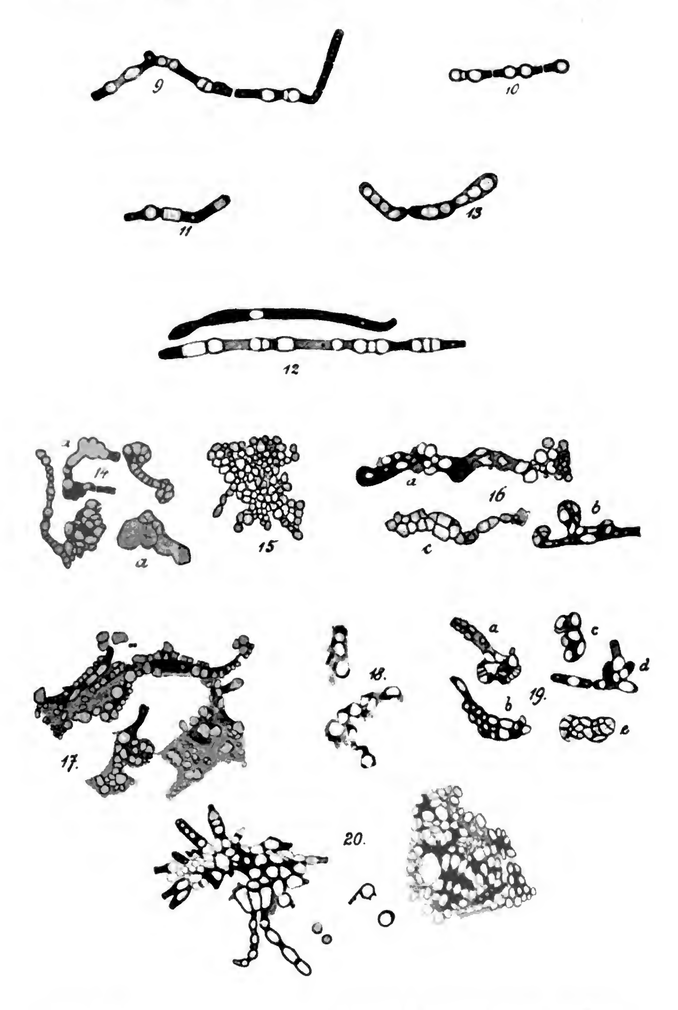
Der Präzipitationsversuch mit 0,25 der 5 Extrakte und je 1 ccm aktiven Rinderserums ergibt rasche typische Ausflockung in 1 und 2, sehr verzögerte und viel geringere in 3, nur Trübung in 4 und 5.

Einsaat 0,05 ccm Bouillonkultur.

| | Extrakt 1 | Extrakt 2 | Extrakt 3 | Extrakt 4 | Extrakt 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 ccm Serum + 0,01 ccm Extrakt | 2180 | 816 | 112 | 0 | 0 |
| 0,1 » + 0,05 » | 19000 | 10000 | 1056 | 1280 | 63 |
| 0,1 » + 0,1 » | ∞ | ∞ | ca. 20000 | 704 | 1916 |




Autor photogr. Verlag von R. Oldenbourg, München und Berlin.




Autor photogr.

Verlag von R. Oldenbourg, München und Berlin.




G.E.STECHERT
& Co.
NEW YORK

